

MARIA RITA SIERAKOWSKI



Icos. Monog.
CACTUS PERESCHIA
(Fig.26) (102)

ALGUNS ASPECTOS QUÍMICOS, FÍSICO-QUÍMICOS E ESTRUTURAIS DA MUCI-
LAGEM EXTRAÍDA DE FOLHAS DE *Pereskia aculeata* MILL

TESE DE MESTRADO APRESENTADA AO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DA U
NIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.

CURITIBA

1982

Tese orientada pelo
Prof. Dr. JOÃO BATISTA CHAVES CORRÊA

BANCA EXAMINADORA COMPOSTA PELOS PROFESSORES

Dr. JOÃO BATISTA CHAVES CORRÊA

Dra. ELIANA M. BARRETO BERGTER

Dra. RITA DE CÁSSIA LEONI FIGUEIREDO RIBEIRO

Curitiba, 26 de janeiro de 1.982

Esse trabalho é dedicado às pessoas mais responsáveis por meu desenvolvimento: a MEUS PAIS e ao Prof. JOÃO BATISTA CHAVES CORRÊA.

AGRADECIMENTOS

- À Dra. BEATRIZ DE FREITAS, pela determinação da osmolaridade.
- Ao Prof. BONIFÁCIO J. GALLÓTTI, pela confiança, apoio e oportunidade inicial.
- À Dra. DÉA AMARAL, pela determinação da galactose-oxidase.
- À Profa. FANY REICHER, pelos ensaios prévios e incentivos recebidos.
- À Dra. GLACI T. ZANCAN, pela presteza demonstrada.
- Aos Profs. Dr. JOSÉ H. DUARTE e Dr. MARCELO IACOMINI, pela correção desse trabalho.
- A Profa. MARIA HELENA B. IMAYUKI, pela atenção dispensada na correção das referências bibliográficas.
- Ao Prof. SIGURD W. BACH, pela correção da parte físico-química.
- À Prof. Dra. VERA M.V. GOMES e ao Prof. MANOEL C.M. DE ARAÚJO, pela confiança demonstrada.
- Aos PROFESSORES, COLEGAS E FUNCIONÁRIOS do Departamento de Bioquímica da U.F.Pr., pelas contribuições e atenções dispensadas.
- À CAPES, FINEP, CNPq e OEA, pelo suporte financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS

p/v	-	peso por volume
V	-	volt
mA	-	miliampere
psi	-	libra por polegada quadrada
η m	-	nanômetro
AcO ⁻	-	acetato
T.F.A.	-	ácido trifluroacético
C.P.	-	cromatografia em papel
T.L.C.	-	cromatografia em camada delgada
G.L.C.	-	cromatografia gás líquido
Rhap	-	ramnopirranose
Galp	-	galactopirranose
Ara β	-	arabinofuranose
Glup A	-	ácido-D-glucurônico
Galp A	-	ácido-D-galacturônico
ml/g	-	mililitro por grama
P.M.	-	peso molecular
G.P.	-	grau de polimerização
$[\mu]$	-	viscosidade intrínseca
μ_{abs}	-	viscosidade absoluta
μ	-	viscosidade relativa
μ_{red}	-	viscosidade reduzida
cps	-	centipoise
$[M]^2$	-	concentração molar ao quadrado
T	-	tempo de retenção
AN	-	fração de açúcares neutros
AA	-	fração de açúcares ácidos
$ \alpha _D^{25}$	-	rotação óptica específica, à 25°C
dm	-	decímetro

ÍNDICE

I	- RESUMO	01
II	- INTRODUÇÃO	03
III	- MATERIAIS E MÉTODOS	21
IV	- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
V	- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

LISTA DE TABELAS

I	- Dados analíticos da mucilagem extraída de folhas de <i>P. aculeata</i>	35
II	- Composição em monossacarídeos determinada por G.L.C. , na forma de alditóis acetato , da mucilagem de folhas de <i>P. aculeata</i>	37
III	- Análise das frações resultantes da hidrólise parcial do polissacarídeo componente da mucilagem de folhas de <i>Pereskia aculeata</i>	42
IV	- Composição das frações neutra (AN) e ácida (AA), separadas em coluna de AGI-X10 (AcO ⁻), resultantes da hidrólise do polissacarídeo componente da mucilagem de folhas de <i>P. aculeata</i> com T.F.A. e analisados por G.L.C., na forma de alditóis acetato	44
V	- Análise da fração de açúcares ácidos metilados, carbóxí-reduzidos, permetilados e analisados por G.L.C. da mucilagem de folhas de <i>P. aculeata</i>	47
VI	- Análise por G.L.C. dos alditóis acetato parcialmente metilado do polissacarídeo componente da mucilagem de folhas de <i>P. aculeata</i> , após Sevag	48
VII	- Análise por G.L.C., na forma de alditóis acetato , dos produtos da oxidação com periodato, do polissacarídeo componente da mucilagem de folhas de <i>P. aculeata</i> ...	53
VIII	- Análise por G.L.C., na forma de alditóis acetato dos produtos de três degradações tipo Smith sequenciadas , do polissacarídeo componente da mucilagem de folhas de <i>P. aculeata</i>	54

- IX - Metilação do polissacarídeo componente da mucilagem de folhas de *P. aculeata* residual de três sucessivas degradações tipo Smith sequenciadas e análise por G.L.C... 55

LISTA DE FIGURAS

- 1 - Cromatografia em papel da fração de oligossacarídeos ácidos da mucilagem de folhas de *P. aculeata* 36
- 2 - Filtração em gel do polissacarídeo colorido com azul de Procion M-3G 40
- 3 - Cromatografia da mucilagem de folhas de *P. aculeata* em Sepharose 6B, eluída com tampão tris-HCl pH 7,2, 0,05M.. 41
- 4 - Espectro de absorção no infra-vermelho do mio-inositol acetilado, isolado por cromatografia preparativa, da fração AA, da mucilagem de folhas de *P. aculeata* 45
- 5 - Espectro de absorção no infra-vermelho de um padrão autêntico de mio-inositol-hexa-O-acetato 45
- 6 - Espectro de absorção no infra-vermelho do polissacarídeo, não metilado, componente da mucilagem de folhas de *P. aculeata*..... 49
- 7 - Espectro de absorção no infra-vermelho do polissacarídeo componente da mucilagem de folhas de *P. aculeata*, após metilação..... 49
- 8 - Determinação do consumo de periodato pelo polissacarídeo componente da mucilagem de folhas de *P. aculeata*.... 52
- 9 - Determinação da viscosidade intrínseca da mucilagem de folhas de *P. aculeata* 60
- 10 - Efeito do pH sobre a viscosidade reduzida da mucilagem de folhas de *P. aculeata*..... 60
- 11 - Efeito da variação da temperatura sobre a viscosidade reduzida da mucilagem de folhas de *P. aculeata*, em pH 4,7 60
- 12-A-F- Efeito de eletrólitos, em diferentes molaridades, e da temperatura, sobre a viscosidade reduzida da mucilagem de folhas de *P. aculeata*, em pH 4,7 61
- 13 - Efeito de eletrólitos, em diferentes molaridades, sobre a viscosidade relativa da mucilagem de folhas de *P. aculeata*, em pH 4,7 62

RESUMO

O pó acetônico tratado com benzeno-etanol (2:1, v/v) de folhas de *Pereskia aculeata*, foi submetido a exaustiva extração com água quente e o extrato, após precipitação etanólica, forneceu um heteropolissacarídeo mucilaginoso. Após sucessivas desproteinizações, pelo método de Sevag, o polímero apresentou 36,0% de açúcar total e a seguinte composição: ramnose, 9,2%; fucose, 2,5%; ribose, 2,5%; arabinose, 27,5%; xilose, 2,5%; manose, 3,0%; galactose, 40,8%, glucose, 3,0%, ácido-D-galacturônico, 9,0%; e mioinositol, calculado em relação ao açúcar total, 4,2%. A amostra continha, ainda, proteína, 3,5%; acetil, 6,72%; cálcio, 1,91%; fósforo, 0,48%, sendo esses valores expressos em relação ao peso seco. As análises físico-químicas de uma solução a 0,4283g% de mucilagem $d^{20}_D = 0,9839$ g/ml, forneceram os seguintes dados: $\mu^{20}_{abs} = 444$ cps; $[\mu]^{20} = 7,0$ (100 ml/g) na faixa de pH de 4,4 a 5,6; $|\mu|^{25} = 7,9$ (100 ml/g) em pH 4,7; μ_{red} decrescente pela adição de μ_{abs} ; $|\alpha|^{25}_D = 29,4$ (0,1542 g% de polissacarídeo).

As filtrações em géis de Sepharose 6B e Sephadex G₁₀₀ + G₂₀₀, indicaram único pico simétrico e a possibilidade de P.M. inferior a 2×10^6 , comparado ao do Blue Dextran; a eletroforese em acetato de celulose apresentou única banda, embora difusa.

A hidrólise ácida parcial indicou a presença de formas piranosídicas e furanosídicas para as unidades de arabinose e galactose. A dosagem pela galactose oxidase realizada no polímero indicou que apenas 8,7% das unidades de galactose, eram suscetíveis à ação da enzima.

O polissacarídeo apresentou um consumo de periodato e uma liberação de ácido fórmico, respectivamente, de 1,22 e 0,62 moles por mol de açúcar anidro.

A análise por metilação dos oligossacarídeos ácidos, obtidos por hidrólise com T.F.A. e separados em resina AG1-X10, forma acetato, indicou possíveis ligações (1 → 2) entre as unidades de ácido-D-galacturônico e ramnose, e (1 → 4) entre as unidades

des de ramnose e o ácido-D-galacturônico.

A metilação do polissacarídeo confirmou a presença de formas furanosídicas para as unidades de galactose (34,5%) e arabinose (25,5%), além de 11,5% de galactopirranose e 3,0% de arabinopirranose.

A avaliação dos dados obtidos pelas hidrólises ácidas parciais, oxidação com periodato, degradação de Smith e metilação sugere que o polissacarídeo de *Pereskia aculeata* é composto por 18% de unidades de gal β ligadas através (1 \rightarrow 6), das quais 9,0% possuem ramificações em C-3 ou vice-versa, por 12% de unidades de gal β ligadas através (1 \rightarrow 5), das quais 9,0% possuem ramificações em C-2 e 3% ramificações em C-3. O polímero é formado, ainda, por 13% de unidades de ara β , das quais 6,5% acham-se ligadas através (1 \rightarrow 5) e 6,5% através (1 \rightarrow 3); por 7% de unidades de gal ρ , ligadas através (1 \rightarrow 4) das quais 3,0% apresentam ramificações em C-6, e por 4,5% gal ρ ligadas através (1 \rightarrow 6).

A definição estrutural dessa macromolécula, sua análise química e seu comportamento físico-químico são, entretanto, dificultados por sua própria complexidade molecular.

INTRODUÇÃO

Substâncias pecticas

As pectinas são um grupo de polissacarídeos que ocorrem em vegetais e são importantes nos fenômenos de crescimento e de formação das membranas celulares: em certas circunstâncias são utilizadas como substâncias de reserva natural.

Distribuem-se em todo reino vegetal, em diversas regiões da planta como raiz, lenho, tecidos jovens e frutos. Em sua forma solúvel encontram-se em maiores quantidades nos frutos maduros (92).

Os trabalhos realizados até 1953, principalmente por HIRST & JONES (23, 24, 84-87), sobre materiais pecticos descrevem a existência de três distintos homopolissacarídeos; uma galacturonana contendo unidades de ácido-D-galacturônico, interligadas através de ligações do tipo α -(1 → 4); uma galactana constituída por unidades de D-galactose interligadas β -(1 → 4); uma arabana contendo uma cadeia ramificada por unidades de L-arabinose ligadas α -(1 → 5) e α -(1 → 3).

A evolução dos métodos de análise, tais como fracionamento em coluna de DEAE-celulose, uso da eletroforese e da filtração em gel de Sephadex, possibilitou o isolamento e a identificação de oligossacarídeos contendo mais de uma espécie de açúcar; nos hidrolisados ácidos parciais de materiais pecticos.

Os dados obtidos por ANDREWS e colaboradores, ao estudarem a pectina da maçã, indicaram a heterogeneidade dessa substância, baseados nos estudos dos oligossacarídeos obtidos por hidrólise ácida parcial (21).

BARRET & NORTHCOTE (21), obtiveram dados confirmando a heterogeneidade do ácido pectínico isolado de material pectico da maçã.

Estudos feitos por STODDART, BARRET & NORTHCOTE (130), em tecidos de plantas em crescimento, (parede celular de câmbio e nódulo de sicômero) revelaram que o ácido pectínico analisado era parecido ao da maçã, ao observarem que o ácido aldobiurônico também era constituído pelo ácido D-galacturônico ligado à ramnose, através de ligação glicosídica α -(1 → 2).

CORRÊA & FONTANA (49) verificaram que a porção neutra, obtida por degradação alcalina, do material pectico de frutos de café cereja, era constituída por uma galactoarabana homogênea que, por hidrólise parcial ácida, liberou oligossacarídeos identificados como 3-O-galactopiranosil-D-galactose, 3-O-galactopiranosil-L-arabinose e 6-O-galactopiranosil-D-galactose. Portanto, as ligações glicosídicas entre as unidades de D-galactose eram do tipo β -(1 → 3) e β -(1 → 6); entre D-galactose e L-arabinose β -(1 → 3) e entre as unidades de L-arabinose do tipo α -(1 → 3) e α -(1 → 5).

Posteriormente CORRÊA et al (50) estudaram os oligossacarídeos ácidos obtidos por hidrólise ácida parcial da pectina de café cereja. Foram identificados por cromatografia em papel o ácido 4-O-(α -D-galactopiranosilurônico)-D-galacturônico e os ácidos aldobiurônicos 2-O-(α -D-galactopiranosilurônico)-L-ramnose, 4-O-(α -D-galactopiranosilurônico)-L-arabinose, além dos seguintes dissacarídeos ácidos nos quais não foram determinados os tipos de ligações glicosídicas: α -D-galactopiranosilurônico-D-galactose, α -D-galactopiranosilurônico-D-xilose, α -D-galactopiranosilurônico-L-fucose e α -D-galactopiranosilurônico-D-glucose. Esses resultados sugerem que o açúcar neutro está combinado à cadeia de galacturanana através de ligação glicosídica, formando um heteropolissacarídeo ácido.

Admite-se, atualmente, que as substâncias pecticas sejam constituídas por uma estrutura altamente ramificada, onde as carboxilas da galacturonana estariam parcialmente esterificadas pelo metanol.

Embora tenham sido elucidadas estruturas de fragmentos neutros dos polissacarídeos de materiais pecticos, existem ressalvas se tais fragmentos existem como polímeros individuais ou

se foram destacados da macromolécula do polissacarídeo heterogêneo, constituído, simultaneamente, por cadeias de unidades de açúcares neutros e por cadeias de unidades de açúcares ácidos.

Gomas e mucilagens

As gomas são substâncias hidrofílicas, constituídas de polissacarídeos dispersíveis em água quente, formando uma mucilagem.

Podem ser classificadas em dois grupos:

- I) gomas reais que formam soluções claras em água e são filtráveis;
- II) gomas que incham, porém não se dissolvem completamente em água; são parcialmente filtráveis e comumente classificadas como mucilagens. Quanto a esse critério de classificação há exceção. Por exemplo, a goma adraganta é parcialmente solúvel em água, e exibe, portanto, aquelas propriedades geralmente atribuídas às mucilagens (90, 92).

As mucilagens podem ser divididas, de acordo com suas características químicas, em três grupos (90).

- a) Polissacarídeos neutros - contendo um ou mais tipos de unidades de açúcares interligados glicosidicamente, formando substâncias de alto peso molecular. São as mucilagens de estrutura mais simples, geralmente constituídas por cadeias pouco ramificadas. De acordo com a natureza de seus constituintes, são classificadas em mananas (salepo), glucomananas (aloes), galactomananas (soja, alfarroba) e arabinomananas (lírio).
- b) Polissacarídeos contendo unidades de ácido urônico - Usualmente D-galacturônico ou um metil éter derivado de ácido urônico, bem como unidades de outros açúcares, sendo portanto de natureza heterogênea em constituição, além de possuírem uma estrutura bastante complexa, ocasionada pelas inúmeras ramificações (92).

- c) Mucilagens - que ocorrem em algas e consistem, principalmente, de sais de ésteres sulfato, constituindo-se em derivados de alto peso molecular (137).

Do que se conhece até agora, sabe-se que as gomas de plantas são sais neutros de polissacarídeos ácidos complexos formados por:

- a) - unidades de hexoses, tais como D-galactose e D-manose na forma piranosídica;
- b) - unidades de ácido D-glucurônico, com exceção da goma adraganta que contém unidades de ácido D-galacturônico;
- c) - unidades de pentoses tais como a L-arabinose, que tanto podem ocorrer na forma furanosídica como na piranosídica (18); e D-xilose que ocorre só na forma piranosídica;
- d) - unidades de metilpentoses como a L-ramnose e L-fucose que assumem a estrutura piranosídica (18, 91). Tem-se previsto, ainda, a presença de D-galactose na forma furanosídica em gomas e mucilagens (18).

Atribui-se às gomas e mucilagens a capacidade de atuar como substâncias de reserva e como as principais substâncias de armazenamento de água, sobretudo nas plantas que vivem em regiões quentes e áridas, onde na época de seca a cederiam lentamente evitando, assim, uma desidratação externa. Para confirmar tal hipótese, cita-se o caso da *Acacia Verek*, que vive habitualmente em terrenos frescos e úmidos e não produz goma em quantidade significativa. Já as Acácias das regiões arenosas, desérticas, que suportam insolações violentas, produzem uma quantidade elevada de goma, até 1 kg ou mais por árvore (72). Admite-se que a quantidade e a qualidade da goma sejam função de condições ambientais, podendo ser o seu metabolismo influenciado por vários fatores tais como água, temperatura, lesão e agentes de infecção (52). Sugere-se que a formação das gomas seja um fenômeno local. Todavia, o isolamento de um complexo arabinogalactana-proteína do xilema de Acer, induz à possibilidade de transporte para o local da exsudação (46).

A pronunciada capacidade de reter água dos exsudatos gomosos, tem conduzido à sugestão de que eles funcionam como uma membrana para isolar a infecção ou a área danificada da planta (52). E, como membrana, poderia prevenir tanto o aumento da infecção como a perda de água no sítio danificado.

Há indicações de que elas ocorrem como mistura de resinas oleogomosas, quando oriundas de canais resinosos. Por exemplo, a mirra é uma resina oleaginosa composta de carboidratos, proteínas e polímeros terpênicos, secretada de canais resinosos de *Commiphora myrrha*, podendo formar sobre o caule nódulos de uma resina oleosa vermelha misturada com vestígios de goma branca (88).

As mucilagens são encontradas em raiz, flores, sementes (tegumentos, endospermas) e bulbos. As gomas encontram-se em diferentes tecidos de plantas superiores, principalmente nos caules, no lenho jovem de diversas Prumáceas, na casca e no líber, como se observa nas Acácias, bem como na região medular de numerosas espécies do gênero *Astragalus* e algumas vezes no mesocarpo. Quando há o rompimento dos tecidos por ferimento, ocorre um escoamento de exsudato formando aglomerados translúcidos ou esbranquiçados (92).

A propriedade de formar, respectivamente, soluções coloidais, soluções mucilaginosas e geléias não é suficiente para caracterizar as gomas, mucilagens e as substâncias pécticas. Tais moléculas complexas podem ser agrupadas dentre as substâncias polidispersas e distinguidas quanto aos seguintes fatores (18):

- a) composição de monossacarídeos e outros constituintes;
- b) proporção quantitativa dos tipos de ligações glicosídicas, nas quais os monossacarídeos estão envolvidos;
- c) grau de ramificação e peso molecular.

As estruturas até agora conhecidas, entretanto, não permitem estabelecer uma fórmula geral, tanto para as gomas, como para as mucilagens. Contudo, todas essas substâncias contêm como

componente comum porções de arabinogalactana, presentes em suas estruturas macromoleculares em diferentes quantidades.

ARABINOGALACTANAS

Macromoléculas constituídas por arabinose e galactose têm sido isoladas de vários tecidos vegetais, tanto na forma livre como ligadas a proteínas através de ligações covalentes. A proporção de açúcar e de proteína, nessa associação, origina dois tipos de substâncias, uma denominada proteoglicana e a outra glicoproteína. Denomina-se proteoglicana a substância na qual uma proteína liga-se por substituição a um polissacarídeo, sendo portanto a cadeia de açúcares o componente em maior proporção (46); glicoproteína é a macromolécula na qual a proteína é substituída por uma ou mais cadeias de oligossacarídeos (97, 104).

As arabinogalactanas e os complexos arabinogalactanas proteína encontram-se amplamente distribuídos em tecidos vegetais, principalmente em exsudatos gomosos e em cultura de células. Já, as glicoproteínas são encontradas em paredes celulares tanto de vegetais inferiores como de superiores.

A grande variação na concentração das arabinogalactanas no interior de árvores individuais, entre as de mesmas espécies e dentre as gimnospermas em geral, não é considerada como uma função vital, e frequentemente está associada a um valor nutritivo.

As propriedades intrínsecas desse tipo de macromolécula são sua adesividade e sua habilidade para associar-se com outras macromoléculas. Desse modo, a adesividade tem sido considerada a sua função primordial (137).

Há muito pouca informação sobre os tipos de células e os tecidos envolvidos na biossíntese desses polímeros (130).

As arabinogalactanas encontram-se presentes em frações pecticas, atuando provavelmente, como uma substância cimen-

tante, no contato de célula a célula (21, 110-111, 127, 130).

Admite-se que as proteoglicanas, contendo hidroxiprolina, presentes em folhas de *Vicia faba* (114), estão associadas também a lipídeos.

É possível que a associação entre os complexos arabinogalactanas-proteína e lipídeos, em vegetais, seja análogo ao que ocorre com os complexos glicolipídeos-proteína de grupos sanguíneos, onde a proteína ou o componente lipídico fica embebido em uma camada lipídica dupla, e o componente carboidrato hidrofílico fica exposto em uma face extracitoplasmática da membrana.

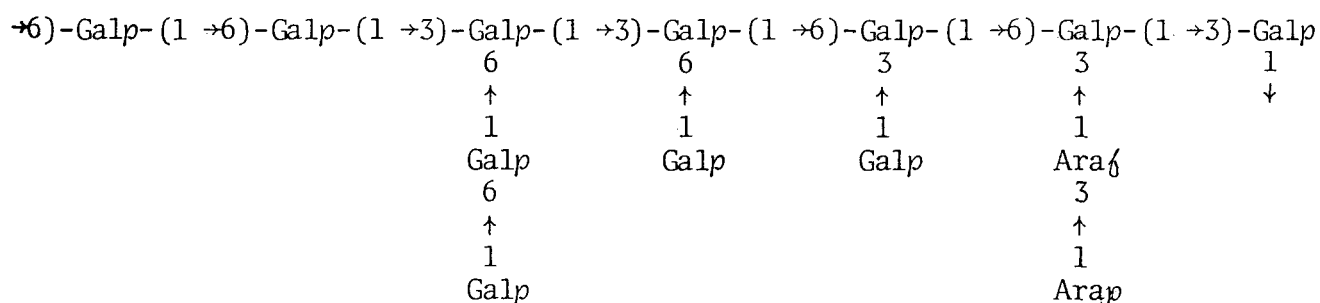
Desde que estão presentes do lado externo da membrana do plasmalema dos protoplastos (46, 98) são considerados como possíveis receptores de β -glucanas iliciadores da fitoalexina, em resposta à infecção por fungos, podendo aglutinar protoplastos de folhas de batata (113).

Há alguma evidência de que os dissacarídeos terminais de cadeias laterais de paredes celulares de algumas plantas podem ter algum significado taxonômico (46). A razão disso é que esses grupos podem estar relacionados com a expressão da identidade de tecidos e dos tipos de células, assim como a identidade das células animais é expressa pela superfície celular determinante, tal como nos grupos sanguíneos. Talvez, a superfície celular ou as arabinogalactanas secretadas, estejam envolvidas no reconhecimento e expressão da identidade, através de uma variação da sequência de sacarídeos terminais de proteoglicanas ou glicolipídeos que têm uma estrutura celular comum.

Em contraste com outros polissacarídeos de paredes celulares não celulósicos, que são essencialmente lineares ou esparsamente ramificadas, as moléculas de arabinogalactanas têm uma estrutura multiramificada.

Moléculas que pertencem à mesma classe das arabinogalactanas foram encontradas em pulmão bovino (115) e na superfície celu-

As arabino-3,6-galactanas são as mais abundantemente encontradas no reino vegetal. Em plantas superiores foram localizadas em sementes, folhas, raízes e frutos (46). Foram encontradas, ainda, na seiva do xilema e em filtrados de cultura de células de tecidos vegetais. Nesse grupo enquadram-se as gomas de plantas. Essas macromoléculas são encontradas em frações de hemiceluloses, solúveis em água, e são extraídas tanto de madeiras duras (angiospermas), como de madeiras moles (gimnospermas). Encontram-se em baixas concentrações nas madeiras duras e coníferas, com exceção das espécies do gênero *Larix*, onde são encontradas interiormente em altas concentrações. Por sua relativa solubilidade as arabinogalactanas são extraídas com água, diretamente da madeira pulverizada, distinguindo-se, assim, de outros polissacarídeos solúveis em água, encontrados em paredes celulares e que são removidos da madeira, após delignificação. As arabinogalactanas estão concentradas no interior da madeira, uniformemente distribuídas em vários tecidos. Para as espécies do gênero *Larix* foi proposta a seguinte estrutura parcial (46):



onde se observa ligações do tipo β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6) na cadeia principal, com ramificações em C-6 e C-3.

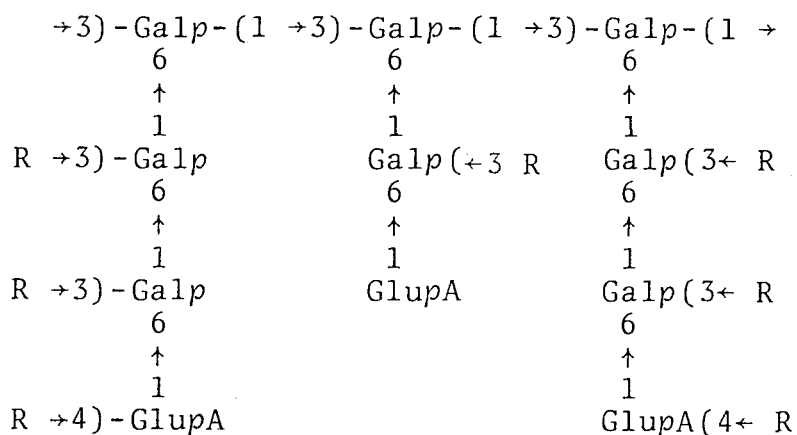
A relação entre os componentes monossacarídicos principais, galactose e arabinose é de 2,6 a 7,8. Em alguns casos o ácido glucurônico encontra-se em posição terminal não redutora, podendo atingir até 7% do açúcar total (*Larix lyalii*). Em *Larix occidentalis* não foi encontrado ácido urônico. As arabinogalactanas de *Larix* geralmente ocorrem como dois componentes; um com alto P.M., entre 37000-100000 (70-95%) e outro com peso molecular menor entre 7500-18000 (5-30%). Também, uma arabinogalactana com alto P.M., foi isolada de *L. occidentalis*, todavia, correspondia a a-

penas 20% do total. Nesse mesmo vegetal a razão galactose: arabinose é maior no componente de menor P.M., e a disposição da arabinose nas duas frações é diferente (46).

Numa revisão sobre o gênero *Larix*, de onde havia sido isolada uma arabinogalactana, o uso da degradação alcalina indicou que a arabinose estava presente não somente nas ramificações, mas, também, na cadeia principal da molécula. Isso foi anteriormente observado em condições de hidrólise suave ácida, na qual somente as ligações furanosídicas poderiam ser quebradas, conduzindo a uma extensiva despolimerização da arabinogalactana de elevados P.M. (G.P. \sim 600), formando fragmentos menores (G.P. 20-48). O processo de degradação alcalina tem demonstrado que, de uma a dez unidades de açúcar, podem estar presentes nas ramificações. A degradação de uma arabinogalactana de *L. occidentalis*, pelo processo da degradação de Smith, resultou em uma galactana degradada com G.P. \sim 12 e ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 3), indicando que algumas unidades de arabinofuranose, vulneráveis a periodato, encontravam-se presentes a intervalos regulares na cadeia principal.

A solução de arabinogalactana a 0,1 M não deu absorção acima de 225 nm, indicando ausência de proteína. Também nitrogênio não foi encontrado em *L. occidentalis*. As arabinogalactanas das espécies do gênero *Larix*, têm uso industrial como aditivos alimentares, como agregantes em comprimidos e são também usadas em litografia.

A goma arábica, também do segundo grupo de Aspinall, tem grande importância industrial. É exsudada de troncos de *Acacia senegal* e sua estrutura, como aquelas do gênero *Larix*, possui ligações de galactopiranosil β -(1 \rightarrow 3) na cadeia principal, com ramificações do tipo β -(1 \rightarrow 6). Difere das arabinogalactanas de *Larix* e do endosperma do falso centeio por apresentar unidades de glucosil na cadeia lateral, conforme a seguinte estrutura parcial (46):



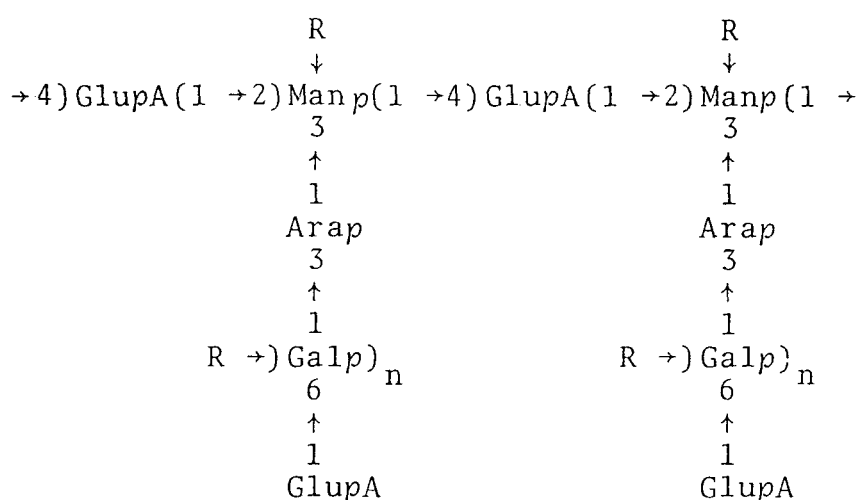
onde R representa mono ou oligossacarídeos envolvendo L-ramnopiranosose, L-arabinofuranose, L-arabinopiranosose, D-galactopiranosose, e, ocasionalmente, D-glucose.

As gomas de *Acácia* têm entre si uma estrutura semelhante, mas em alguns casos variam em sua constituição e organização.

São solúveis em água, embora algumas dissolvam somente em alcali diluído, ou após tratamento com boroidreto de sódio. O P.M. varia de 47×10^3 a 32×10^5 e o conteúdo de nitrogênio de 0,02% a 1,66%. A quantidade de proteínas calculada em relação ao conteúdo de nitrogênio, varia, portanto, de 0,13 a 10,38%. As poucas análises de aminoácidos realizadas não indicaram ligação carboidrato-proteína nessas macromoléculas. Os trabalhos de ANDERSON et al mencionaram serina, treonina e ácido aspártico em proporções relativamente altas. A presença de prolina e leucina em altas concentrações foi qualitativamente constatada em goma de *Lannea*. A relação galactose:arabinose varia de 0,3 a 12. As ligações glicosídicas entre as unidades de galactose da cadeia principal são do tipo β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6). O conteúdo de ácido urônico (ácido galacturônico, ácido glucurônico e seus metoxi derivados varia de 4 a 16%). Amostras que outrora foram consideradas homogêneas, atualmente mostram-se heterogêneas por análise eletroforética e/ou por teste sorológico (46).

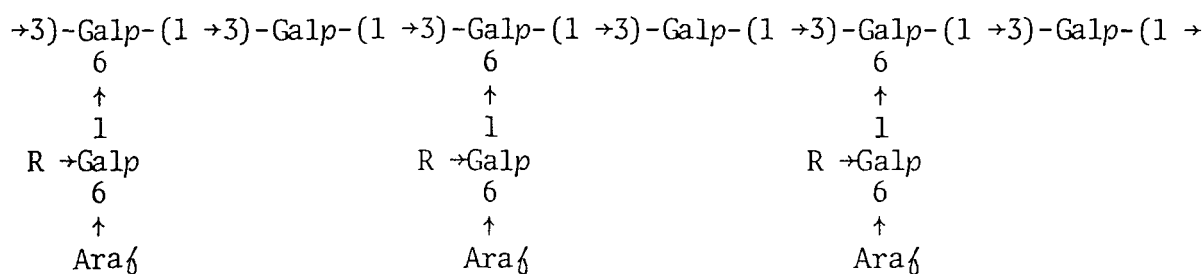
Outro tipo de estrutura parcial de arabinogalactanas é a proposta, a seguir, para a goma extraída de *Anogeissus latifolia*

lia (goma ghatti), onde R representa: Ara-(1 →6)-Man; Ara-(1 →2)-Ara-(1 →6)-Man; Ara-(1 →3)-Ara-(1 →6)-Man; Ara-(1 →5)-Ara-(1 →6)-Man ou Ara-(1 →3)-Gal (46):



Componentes de complexos pectícos com galacturonoramina como cadeia principal, possuindo cadeias laterais de arabinogalactana, foram isoladas de paredes celulares de *Acer callus*. Em pectinas de *Panax ginseng*, as cadeias laterais podem estar ligadas a unidades de ramnose e, em pectina de *Lostera marina*, por unidades de ácido galacturônico.

O terceiro grupo é representado pelo complexo arabinogalactana-proteína extraído de células e suspensão de culturas de endospermas do falso centeio (*Lolium multiflorum*). Essa macromolécula possui um P.M. de 2×10^5 a 3×10^5 , onde 95% de carboidratos estão associados a 5% de proteínas. O componente polissacárido consiste quase que exclusivamente de unidades de galactose e arabinose na proporção de 1:1,7. Nenhum ácido urônico foi encontrado. A cadeia principal é formada de galactopiranosil ligados através de β -(1 →3), contendo ramificações laterais de galactopiranosil β -(1 →6), que por sua vez são substituídas por outras ramificações de arabinofuranosil α -(1 →6) e α -(1 →3), constituindo-se, assim, numa estrutura complexa multiramificada, representada a seguir (46):



onde R, representa ligação Ara ζ (1 \rightarrow 3). Frequentemente arabinose terminal encontra-se na forma piranosídica, como nas arabinogalactanas-proteína de *Fontinalis antipyretica* e de *Nicotiana tabacum*. Os baixos valores de rotação óptica positiva ou negativa, provavelmente refletem a preponderância de configuração β -D- e α -L de unidades de galactose e arabinose, respectivamente.

Arabino-3,6-galactanas foram isoladas pela precipitação de extratos de plantas com o antígeno artificial β -glicosil, também denominado antígeno de Yariv. Essa reação tem sido utilizada, não somente para o isolamento de arabinogalactanas-proteína mas, também, para a sua localização histoquímica em tecidos de planta e em superfícies protoplasmáticas (46).

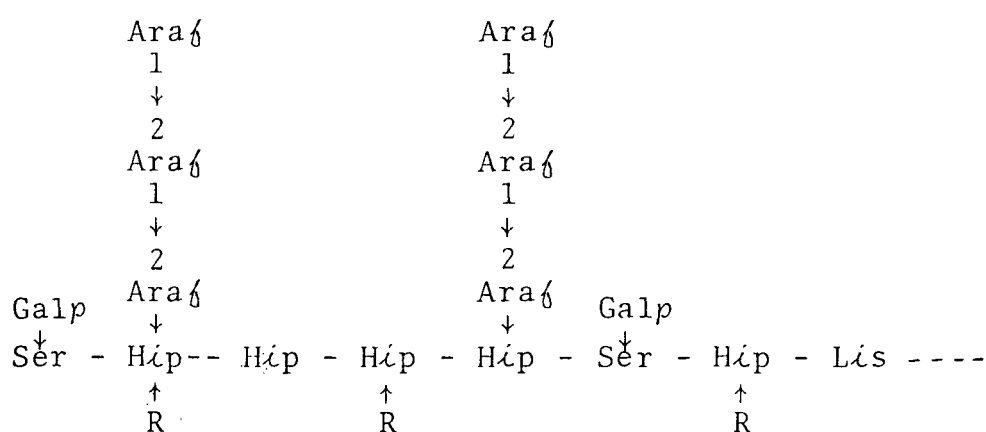
A análise dos aminoácidos dos complexos arabinogalactanas-proteína, isolados por precipitação com o antígeno de Yariv, mostrou altas concentrações de alanina, hidroxiprolina e serina. Entretanto, nenhum polipeptídeo de proteoglicanas foi isolado intacto para o estudo da sequência de aminoácidos. Hexosaminas têm sido encontradas em teores de até 2,0% e, a presença de um aminoácido básico, com comportamento cromatográfico semelhante ao da ornitina, foi constatada em lectinas de batata.

Na ligação entre o polissacarídeo e a proteína, a hidroxiprolina é apontada como o elo de ligação, devido a sua frequente presença em complexos arabinogalactanas-proteína. A estabilidade da porção galactana da arabinogalactana do endosperma do trigo ao tratamento alcalino drástico (NaOH 5M, 100°C, 24 horas), bem como o aumento da hidroxiprolina nos produtos de degradação, indicam ligações glicosídicas envolvendo esse aminoácido e a galactose. Isso foi confirmado pelo isolamento e identificação de

4-O- β -D-galactopiranosil-L-prolina após a degradação da amostra . Também, ligações álcali lábeis de D-galactosil-O-serina, foram encontradas em proteoglicanas isoladas de folhas de *Canabis sativa*, possivelmente presentes na cadeia principal da arabinogalactana - proteína. Uma outra ligação álcali estável do tipo glicosil-hidroxirolina foi encontrada em folhas de *Canabis sativa* da África do Sul, porém, não na da Tailândia. Assim, em um grande número de proteoglicanas de animais e plantas, mais de um tipo de ligação carboidrato-aminoácido pode ser encontrada em uma molécula do polímero (46).

GLICOPROTEÍNAS CONTENDO GALACTOSE E ARABINOSE

As glicoproteínas contendo galactose e arabinose, encontradas em paredes celulares de plantas, algumas vezes têm sido denominadas de extensina, termo aplicado quando se verificou a participação dessa glicoproteína no controle do alongamento do polímero. Nesses polímeros, os oligossacarídeos de arabinose estão provavelmente ligados a unidades de hidroxiprolina, enquanto que as unidades de galactose encontram-se ligadas à serina, conforme a estrutura abaixo (46):



onde R representa:- Ara β -(2 \leftarrow 1)-Ara β -(2 \leftarrow 1)-Ara β -(3 \leftarrow 1)-Ara β

As glicoproteínas podem estar intimamente associadas aos polissacarídeos de parede celular, insolúveis em água, especialmente com a celulose. Outras glicoproteínas solúveis e inso

lúveis em água, contendo arabinose e galactose foram encontradas em tubérculos e nódulos da batata bem como em paredes celulares de plantas (46).

APLICAÇÕES DAS MUCILAGENS (52)

As substâncias mucilaginosas incluindo as gomas, pectinas e até os amidos, utilizam-se na terapêutica pela sua ação protetora das mucosas inflamadas, das vias respiratórias, digestivas, genito-urinárias, por impedirem a atividade de substâncias irritantes e promoverem, também, a diminuição do estado inflamatório, mitigando as dores.

Atuam indiretamente como laxativos, por absorverem uma grande quantidade de água evitam o endurecimento das fezes pois, devido ao aumento do volume do bolo intestinal, emprestam-lhe uma consistência normal e facilitam a sua movimentação, ao mesmo tempo que, por via reflexa, excitam as contrações intestinais.

Em certos casos atuam como antidiarreicos, devido a sua natureza coloidal, pois impedem a ação das substâncias irritantes sobre a mucosa intestinal, talvez até das bactérias.

Externamente usam-se sob a forma de cataplasmas, por conservarem durante mais tempo o calor úmido sobre certas zonas do corpo que suportam inflamação de origem bacteriana ou reumatismal, provocando aí uma congestão sanguínea (hiperemia) benéfica. Em Farmácia tem a vantagem de diminuir a atividade irritante de certos fármacos e de lhes corrigir o gosto, particularmente a sensação da acidez, motivo pelo qual se empregam associados à medicamentos. Em frutas, como a framboesa que contém mais ácidos livres que as groselhas, o gosto ácido é atenuado devido ao maior conteúdo de mucilagens.

São usadas como estabilizadores na preparação de emulsões, pomadas, pastas e em comprimidos por facilitarem a desagregação; em bacteriologia, nos meios de cultura; na análise química, como colóides protetores.

Na indústria de alimentos são empregadas no fabrico de geléias, doces diversos, e outras aplicações análogas as das gomas.

Assinalam-se algumas incompatibilidades na preparação de medicamentos, como substâncias que precipitam as mucilagens das suas soluções: álcool, taninos, sais de ferro e outros (52).

ALGUMAS CARACTERÍSTICAS GERAIS DA *Pereskia aculeata* MILL

A *Pereskia aculeata* é, também, conhecida vulgarmente como GROSELHA DA AMÉRICA, GROSELHEIRA DOS BARBADOS, GROSELHEIRA DAS ANTILHAS, ROSA-MADEIRA, ORA-PRO-NOBIS (51). Pertence à família das Cactáceas que compreende plantas epífitas e terrícolas e que têm como habitat natural as regiões áridas, semi-áridas e encostas rochosas; são, também, facilmente adaptáveis às selvas tropicais e sub-tropicais. O gênero *Pereskia* foi encontrado em altitudes de até 4700 m (119). São plantas nativas da América, as vezes consideradas indígenas em África Tropical, Madagascar e Ceilão (58, 74). As Cactáceas são numerosas no México, estendendo-se por todo o resto do Novo Mundo, onde o Brasil ocupa o segundo lugar em distribuição. A *Pereskia aculeata*, no Brasil, se distribui desde a Bahia até o Rio Grande do Sul (51), tendo sido relatada a sua presença em Curitiba por ANGELY (11). Plantas da mesma família produzem "arabanas" e "galactanas", com as quais formam abundante mucilagem, diversos ácidos orgânicos e sais dos mesmos, sobretudo malato e oxalato de cálcio, diversos açúcares, glicosídeos saponínicos do ácido cereínico e sobretudo alguns alcalóides, como os de *Lophophora Williamsii*, de efeitos embriagadores, capazes de acabar a febre e a sede, e de produzir grande euforia (69).

As células do parênquima das folhas de *P. aculeata* são globosas e aquelas da capa média cortical estão cheias de mucilagem. Pela análise microscópica de um corte com álcool, observa-se massas mucilaginosas extraordinariamente abundantes e estratificadas em capas. As células com mucilagem se apresentam em grande quantidade nas partes da planta mais expostas à dessecação (58). CAMINHOÁ (36) já

havia descrito o Ora-Pro-Nobis como "planta graxa ou succulenta e do mesmo modo que o amido pode se transformar em dextrina, em condições fisiológicas, a celulose pode modificar-se em virtude de reações químicas biológicas e constituir a mucilagem; sem que seja preciso sempre haver um estado anormal, ela existe em muitos vegetais em plena saúde".

Em Cactáceas os talos, quando feridos, prontamente se cobrem com uma película branca e dura que impede a entrada de microrganismos e a putrefação. O surgimento dessa película está relacionado diretamente com a umidade e a temperatura do ambiente. O sumo mucilaginoso extraído de espécies congêneres silvestres pela maceração do vegetal em água e misturado com cal, é usado para branquear galpões e telhados de zinco. Os "artículos" destituídos da epiderme são usados para clarificar a água. Seus corpos sugosos após queimados os espinhos, são empregados como forragem e para aplacar a sede do gado (58).

Algumas espécies de *Pereskia* contêm ação emoliente quando aplicadas sobre tumores duros, outras contêm princípios que atuam sobre músculos contusos, artrite reumatóide, como anti-helmínticos, purgativos, epistáticos, xaropes para a tosse, como antídoto da estricina outras produzem corantes como a anilina (58). De importância fundamental é o fato das Cactáceas serem utilizadas pelo homem como alimento (51, 58, 74, 119).

As folhas e os frutos de *Pereskia aculeata* são comestíveis, principalmente em misturas com feijão, carne e farinhas. Na Medicina caseira suas folhas têm ação emoliente e os frutos são empregados no tratamento da tosse e da sífilis (51). O valor nutritivo do Ora-Pro-Nobis, foi inicialmente descrito por ALMEIDA FILHO & CAMBRAIA (55). Estudos complementares realizados sobre o concentrado de folhas, extraídos com água quente e variando-se o pH de 3,0 a 10,0, foram realizados por DAYRELL & VIEIRA (55). O teor de proteína nesse concentrado era de 51,07%, correspondendo a 25,4% de sua base seca. A análise dos aminoácidos revelou que era comparável às referências da FAO, concernentes aos aminoácidos essenciais, exceto para metionina. Os referidos autores veri-

ficaram, ainda, que a *Pereskia aculeata* poderia ser uma boa fonte de proteínas em concentrados de folhas e que, o resíduo fibroso, devido à sua alta digestibilidade, poderia ser usado por ruminantes (56).

O presente trabalho, teve por objetivo o estudo de alguns aspectos químicos, físico-químicos e estruturais da mucilagem extraída das folhas de *Pereskia aculeata*.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS

REAGENTES

Os reagentes empregados apresentavam as características PA-ACS. O etanol empregado na precipitação do polissacarídeo e a acetona empregada em sua secagem apresentavam a especificação "técnica".

POLARIMETRIA

A rotação ótica do polissacarídeo foi determinada em polarímetro Perkin Elmer modelo 141, à 25°C, de solução aquosa contendo 0,1542g% do polissacarídeo, com a raia D de sódio e caminho óptico de 0,1dm.

ELETROFORESE

A homogeneidade do polissacarídeo foi verificada, através de eletroforese, em fitas de acetato de celulose (Cello-gel), após coloração da amostra com Azul de Procion M-3G (Cia Imperial de Indústrias Químicas do Brasil), pelo método de DUDMAN & BISHOP (64). Esse ensaio foi realizado em aparelho Fanem, 250-350 V, 7mA, 10 min, com câmara de imersão da Chametron e tampão borato 0,2M, pH 9,2.

ÍNDICE DE pH

A leitura e o ajustamento do potencial hidrogênionico foram efetuados em aparelho Clamann & Gralmert MV 85 (Dresden).

ESPECTROFOTOMETRIA

As determinações espectrofotométricas foram efetuadas em:

- a) - aparelho Coleman Júnior, modelo 6A, para a região do visível;
- b) - aparelho Beckman, modelo AccuLab 10, para a região do infravermelho. As pastilhas foram feitas utilizando-se 300 mg de brometo de potássio para 3 a 5 mg de polissacarídeo, e foram obtidas em prensa (Carver Laboratory Press, modelo C-Fred S. Carver Inc), sob vácuo e pressão de 19000 psi.

CONCENTRAÇÕES

As evaporações foram realizadas à vácuo, à temperatura de 30-40°C, com exceção dos ésteres da fração ácida e dos produtos de metanólise do polissacarídeo metilado que foram evaporados em banho de água à vácuo à temperatura de 20-30°C.

ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

As cromatografias em papel (C.P.) foram efetuadas pela técnica ascendente, através de desenvolvimentos singulares e/ou múltiplos utilizando-se papel Whatman nº 1 e 3-MM. Os solventes utilizados foram:

- a) n-Butanol : piridina : água (6 : 4 : 3, v/v)
- b) Acetato de etila : ácido acético : ácido fórmico : água (18 : 3 : 1 : 4, v/v)
- c) Benzeno : n-butanol : piridina : água (1 : 5 : 3 : 3, fase superior)
- d) Acetato de etila : ácido acético : água (18 : 7 : 8, v/v).

Visualizador: nitrato de prata alcalino (135).

Os cromatogramas em camada delgada (T.L.C.) foram feitos em placas (20 x 20 cm) de sílica gel Merck, com 0,25mm de espessura, utilizando-se os solventes:

- e) Acetato de etila : éter de petróleo : clorofórmio (3 : 3 : 1, v/v)

f) n-Butanol : acetona : tampão fostato pH 5,0 (4 : 5 : 2, v/v), em placa tamponada no mesmo tampão

g) Solução aquosa de fenol à 75% (v/v)

Visualizador : ácido sulfúrico à 5% em metanol (v/v) para o solvente e; fosfato de anilina para o solvente f (89) e ninhidrina à 0,1% em acetona (p/v) para o solvente g (57).

As análises por cromatografia gasosa (G.L.C.) foram efetuadas em aparelho da Varian, modelo 2440, com detetor de ionização de chama, utilizando-se o nitrogênio como gás de arraste e velocidade de deslocamento da carta de 20 cm/hora. As colunas empregadas foram: Coluna A - 3% de ECNSS sobre "Gás Chrom Q" de 100-120 mesh, em tubo de aço inoxidável 120 x 0,4 cm (d.i.), com detector à 240°C injetor à 190°C e fluxo de nitrogênio à 37,5 ml/min. A temperatura da coluna, para os produtos de hidrólise na forma de alditóis acetato era de 175°C; para as análises dos alditóis acetato parcialmente metilados (101), bem como para os produtos da de gradação de Smith, na forma de alditóis acetatos, era de 150°C. Coluna B - 3% de OV-225 sobre "Gás Crom Q" de 100-120 mesh, em tubo de aço inoxidável de 200 x 0,15 cm (d.i.), com detector à 240°C, injetor à 190°C e fluxo de nitrogênio à 40,0 ml/min. A temperatura de operação da coluna para os produtos de hidrólise, na forma de alditóis acetato era de 190°C e, para os alditóis acetato parcialmente metilados, 170°C.

Os tempos de retenção (T) relativos dos produtos parcialmente metilados e acetilados, foram calculados com referência ao 1,5-di-O-Acetil-2,3,4,6-Tetra-O-Metil-D-glucitol. A identificação do inositol foi feita usando-se um padrão do mesmo previamente acetilado, utilizando-se as colunas A e B.

As determinações quantitativas dos materiais analisados por G.L.C. foram obtidas de acordo com o método da triangulação, conforme SAWARDEKER e colaboradores (117).

DOSAGENS

- Carboidrato total, pelo método fenol - sulfúrico

descrito por DUBOIS e colaboradores (63), com as leituras efetuadas à 490nm, usando-se a D-glucose em ácido benzóico como padrão (40,0 µg/ml); ácidos urônicos, pelo método de BITTER & MUIR (30), usando-se o ácido D-galacturônico como padrão (11,43 µg/ml); O-acetil, pelo método de HESTRIN modificado por DOWNS e colaboradores (62), com a glucose hexa-acetato como padrão (3,0 µg/ml); fósforo, pelo método de BARTLETT (22), sendo utilizado o fosfato monobásico de sódio (36,2 µg/ml), como padrão; cálcio, segundo o método descrito por CLARCK & COLLIP (45); sulfato, pelo método da benzidina descrito por ANTONOPOULOS (12), usando-se como padrão o sulfato de sódio anidro (22,5 µg/ml); nitrogênio total, pelo método de micro Kjeldahl (110) e, utilizando-se o fator 6,25, determinou-se o teor proteico; hexosaminas, conforme BOAS (33) modificado por DISHE (60) utilizando-se a glucosamina (15 µg/ml) como padrão; metoxil, segundo o método de SCHULTZ (118); umidade, em estufa à 100°C (125); resíduo calcinado, em estufa à 800°C (125).

HIDRÓLISES ÁCIDAS

As hidrólises totais e parciais foram feitas com os seguintes ácidos, tempos e concentrações (122):

- a) ácido trifluoracético 1,0 N, durante 4 horas, em banho de água fervente;
- b) ácido sulfúrico 72%, durante 3 horas à temperatura ambiente. Após adicionou-se água, até a concentração final de 10%, e completou-se a hidrólise depois de 2 horas, em banho de água fervente;
- c) ácido sulfúrico 1,0 N, durante 5 horas, em banho de água fervente;
- d) ácido clorídrico 6,0 N, em estufa à 100°C, durante 24 horas.

Os excessos de ácido trifluoracético e de ácido clorídrico foram removidos por sucessivas evaporações a vácuo, das soluções hidrolisadas.

O excesso de ácido sulfúrico foi tratado com carbo-

nato de bário até pH 4,5-5,0 e, o sulfato de bário formado, eliminado por centrifugação. O sobrenadante foi eluído em resina trocadora de íons Dowex 50W-X8, forma H^+ (200-400 mesh), com a finalidade de reter cátions remanescentes do processo de neutralização.

A hidrólise ácida parcial do polissacarídeo foi feita com ácido sulfúrico 0,05N (2), em banho de água fervente durante 35 min. Ao hidrolisado foi adicionado etanol suficiente para dar uma concentração final de 85%, obtendo-se um precipitado e um sobrenadante separados por centrifugação e denominados de frações P_1 e S_1 , respectivamente. A fração P_1 foi novamente hidrolisada nas mesmas condições acima descritas, obtendo-se as frações P_2 e S_2 e, assim sucessivamente, as frações P_3 , S_3 , P_4 e S_4 . As frações S_1 , S_2 , S_3 , S_4 e P_4 foram evaporadas a vácuo para a remoção do etanol e submetidas à hidrólise ácida total com H_2SO_4 1 N, (em banho de água fervente, durante 5 h), para serem analisados por G.L.C., na forma de alditóis acetato.

ACETILAÇÃO DE ALDITÓIS

Os monossacarídeos obtidos por hidrólise foram reduzidos com boroidreto de sódio (12 horas à temperatura ambiente) e então deionizados com Dowex 50W-X8, forma H^+ (200 - 400 mesh), evaporados a vácuo e desboratados por sucessivas evaporações com metanol. Os alditóis foram acetilados usando-se anidrido acético: piridina (1: 1, v/v). A extração dos alditóis acetato foi realizada segundo WOLFROM & THOMPSON (139) e então analisados por G.L.C., nas colunas A e B.

EXTRAÇÃO DA MUCILAGEM

Preparo do pó acetônico

As folhas verdes de *Pereskia aculeata* foram coletadas ao acaso em meados de setembro de 1978, no município de Viçosa, Minas Gerais. Primeiramente foram mergulhadas em etanol por 72 horas, secas ao ar, submersas em acetona por 48 horas, com posterior exposição ao ar para secagem. A seguir, as folhas foram tri

turadas em Moinho de Wiley, utilizando-se peneira de 60 mesh. O pó acetônico obtido foi submetido ao processo de extração em aparelho de Soxhlet, usando-se a mistura de benzeno : etanol (2: 1, v/v), por 48 horas. O extrato resultante foi desprezado.

Extração da mucilagem

O pó residual do tratamento com benzeno-etanol (com 13% de rendimento a partir das folhas verdes) foi submetido ao processo de extração com água (600 ml/30 g de pó) à 85°C, com agitação, durante 24 horas, e o sobrenadante viscoso isolado por centrifugação. O resíduo foi novamente submetido a duas extrações, como acima descrito, e os sobrenadantes foram reunidos e, então, dializados em água corrente, durante 24 horas. Em seguida, etanol (3 vol.) foi adicionado, obtendo-se um precipitado que foi separado por centrifugação, desprezando-se o sobrenadante etanólico. O precipitado contendo o polissacarídeo foi lavado com acetona (3 vezes) e secado em aparelho de Abderhalden. Obteve-se 5,916 g de mucilagem em peso seco, antes do processo de desproteção de Sevag, e com ela foram efetuadas todas as análises mencionadas no item de dosagens (Tabelas I e II).

COMPOSIÇÃO RELATIVA EM MONOSSACARÍDEOS

Amostra da mucilagem (10 mg), foi hidrolisada totalmente com H_2SO_4 (letra b da hidrólise ácida total) e analisada por C.P. (solventes a-f). O hidrolisado remanescente foi reduzido e acetilado como descrito anteriormente e, então, analisado por T.L.C. (solvente e), e por G.L.C. nas colunas A e B (Tabela II). Uma cromatografia preparativa dos alditóis acetato foi realizada por T.L.C., no solvente e. Após a localização das manchas por nebulização de tiras laterais (2 cm) com ácido sulfúrico à 5% em metanol (v/v) aquecimento à 150°C, o componente com R_x 0,66 foi removido da placa, reanalisado por G.L.C. (colunas A e B) e comparado com o inositol hexa-O-acetato.

PRECIPITAÇÃO COM SAL DE AMÔNIO QUATERNÁRIO

Amostra da mucilagem (1,27 g) foi solubilizada em água (520 ml) e a solução polissacarídica, pH 4,7, foi corrigida para pH 7,0 com hidróxido de sódio 0,1N. Em seguida, adicionou-se lentamente, com agitação, brometo de cetiltrimetilamônio (Cetavlon). Nessa técnica de precipitação, levou-se em conta as concentrações e quantidades ótimas da amostra e a de detergente (120, 121). O sobrenadante e o complexo mucilagem detergente foram separados por centrifugação. O complexo foi dissolvido em ácido acético a 10%, precipitado com etanol (3 volumes) e centrifugado, desprezando-se o sobrenadante etanólico. O precipitado foi lavado sucessivamente com etanol, depois com acetona e secado em aparelho de Abderhalden.

ANÁLISES QUALITATIVAS DE AMINOÁCIDOS

A mucilagem (20 mg) foi hidrolisada com HCl 6N (em estufa a 100°C, durante 24 h) e submetido a sucessivas evaporações e vácuo para a remoção do excesso de ácido. Em seguida, os produtos da hidrólise foram analisados por T.L.C. (solvente g), visualizando-se as manchas da cromatoplaça com ninhidrina 0,1% em acetona.

MATERIAIS E MÉTODOS ESPECIAIS

DESPROTEINIZAÇÃO SEGUNDO SEVAG

A mucilagem (3 g) foi desproteïnizada de acordo com o processo descrito por SEVAG e modificado por STAUB (128), durante 12 horas, a temperatura ambiente. O processo foi repetido por mais 7 vezes. Após a desproteïnização, foram efetuados todos

os ensaios citados no ítem de dosagens (Tabela I e II). O polissacarídeo desproteinizado (10 mg) foi submetido à hidrólise ácida total com H_2SO_4 (letra b da hidrólise ácida total) e os monossacarídeos analisados por G.L.C., na forma de alditóis acetado, nas colunas A e B (Tabela III).

FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX

Uma amostra de mucilagem (45 mg), foi colorida com azul de Procion M-3G, segundo o método de DUDMAN & BISHOP (63); e aplicado em coluna (40 x 2,0 cm, d.i.), contendo uma mistura de Sephadex G_{100} e G_{200} (1:1) (13), a qual foi eluída com água destilada, com uma velocidade de escoamento de 2,5ml/hora. As frações de 2,5 ml foram coletadas à temperatura ambiente, em coletor automático de frações Buchler Instruments. As absorvâncias de cada fração coletada foram efetuadas à 605 nm e os valores obtidos foram diagramados contra volume (Figura 2).

FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHAROSE

Uma solução mucilagínosa (0,5 ml), com concentração de 70 mg/ml, foi aplicada ao topo de uma coluna (38,5 x 2,0 cm, d.i.) contendo Sepharose 6B (44), preparada com tampão tris-HCl 0,05 M, pH 7,2 e calibrada com Blue Dextran. A amostra foi eluída com o mesmo tampão, com uma velocidade de fluxo de 1,25 ml/hora. As frações de 2,5 ml foram coletadas à temperatura ambiente, em coletor de frações, e analisadas pelo método do fenol-ácido sulfúrico (63). Os valores obtidos de D.O. foram diagramados versus volume (Figura 3).

DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA DA D-GALACTOSE

Para a determinação da D-galactose foi utilizada a enzima D-galactose oxidase, purificada a partir do meio de cultivo do fungo *Dactylium dendroides* (4). O meio de incubação continha 22 unid/ml min^{-1} (400 μ g de enzima purificada ou 55 unid/mg de proteína), 1,0 ml de reagente peroxidase-O-dianisidina (reagente cromogênico) e 1,0 ml de mucilagem contendo 896 μ g de açúcar total. O sistema foi mantido à 30°C, por 60 minutos. A absorvância foi determinada à 420 nm, utilizando-se padrão de D-galactose de 30 μ g/ml.

HIDRÓLISE PARCIAL DO POLISSACARÍDEO COM T.F.A. E ANÁLISE DAS FRAÇÕES NEUTRA E ÁCIDA

A mucilagem após Sevag, (103,5 mg) foi hidrolisada com T.F.A. 1N, 4h em banho de água fervente. Após a remoção do ácido por evaporação o hidrolisado foi aplicado em coluna (15 x 2 cm) de resina AG1-X10 forma AcO^- (200-400 mesh). Os açúcares neutros (AN) foram eluídos com água (3 vezes o volume do leito da coluna) e os açúcares ácidos (AA), com ácido acético a 30%. O eluato ácido foi evaporado a vácuo, por evaporações sucessivas com água, com a finalidade de eliminar o excesso de ácido acético do meio. A fração AN foi analisada por G.L.C., na forma de alditóis acetato, na coluna B, conforme indica a Tabela IV.

Uma alíquota da fração AA foi analisada por C.P. (figura 1) no solvente b usando-se padrões de ácido -D-galacturônico e ácido -D-glucurônico, como revelador usou-se o nitrato de prata alcalino (135).

CARBOXI-REDUÇÃO DA FRAÇÃO DE AÇÚCARES ÁCIDOS

A redução do grupo carboxila das unidades de ácido urônico foi efetuada pelo método de BLAKE & RICHARDS modificado (32). A amostra de AA (1,0 mg) foi secada em aparelho de Abderhalden e esterificada com metanol anidro contendo 5% de cloreto de hidrogênio. Após duas horas de refluxo, a mistura esterificante foi neutralizada com carbonato de prata e o precipitado removido por centrifugação. O sobrenadante foi lavado com metanol e evaporado a vácuo. Em seguida, adicionou-se solução de ácido bórico 0,4 M e solução aquosa de boroidreto de sódio, gota a gota, por um período de 3 horas, mantendo-se o pH em torno de 7,0. Após a redução, o excesso de boroidreto foi decomposto com ácido acético a 30%. A solução foi deionizada com resina Dowex 50W-X8, forma H^+ (200-400 mesh), evaporada a vácuo até a secura, e o resíduo desboratado por sucessivas evaporações com metanol. O processo de esterificação e redução foi repetido por mais duas vezes, e o produto resultante foi secado em aparelho de Abderhalden. O produto carboxi-reduzido foi hidrolisado com H_2SO_4 1N, (durante 5 horas, em banho de água fervente), reduzido com

boroidreto de sódio em tampão borato 0,4M e, então, acetilado para a análise por G.L.C. nas colunas A e B (Tabela IV).

METILAÇÃO DOS ÁCIDOS ALDOBIURÔNICOS CARBOXI-REDUZIDOS

A carboxi-redução dos ácidos aldobiurônicos foi, ainda, efetuada pelo seguinte processo: a amostra de AA (7 mg) foi metilada pelo método de HAKOMORI (78), a fim de se metilar os grupos hidroxila e esterificar os grupos carboxila. Os produtos resultantes foram dissolvidos em metanol (2 ml) e tratados com boroidreto de sódio, durante 1 hora, para a redução dos grupos metilester. O material foi, então, evaporado a vácuo até a secura, extraído com clorofórmio (3 vezes) e, então, permetilado. O material metilado foi hidrolisado com H_2SO_4 1N durante 5 horas, em banho de água fervente e, posteriormente, analisado por G.L.C., na forma de alditóis acetato parcialmente metilados, nas colunas A e B (Tabela V).

METILAÇÃO DO POLISSACARÍDEO

Processo de Haworth

O polissacarídeo, purificado pelo processo de Sevag, (50 mg) foi submetido, primeiramente, ao processo de metilação de HAWORTH (81). Ao polissacarídeo foi adicionado boroidreto de sódio (5 mg) e hidróxido de sódio a 45% (8 ml). Sob atmosfera de nitrogênio a agitação vigorosa, deixou-se solubilizar durante 4 horas. Em seguida, foi colocado acetona (1ml) e sulfato de dimetila (3 ml). A adição desse último reagente, gota a gota, durou 8 horas, no final da qual a mistura reagente foi agitada por mais 12 horas. Todo esse tratamento foi conduzido à temperatura ambiente. Após, a mistura metilante foi neutralizada com H_2SO_4 5 M, gota a gota, em banho de gelo, adicionando-se uma gota de fenolftaleína para controle do ponto de viragem. A fração parcialmente metilada foi dialisada contra água corrente (24 horas).

O processo de metilação foi repetido mais duas vezes.

Processo de Hakomori

O polissacarídeo parcialmente metilado, foi submetido a metilação segundo HAKOMORI (78) modificado por SANDFORD & CONRAD (116). O método

consiste em formar o alcóxido do polissacarídeo pela adição de metil-sulfinil carbanion, antes da adição do agente metilante iodeto de metila (47). A princípio, o polissacarídeo parcialmente metilado foi secado sob pentóxido de fósforo e a seguir colocados em balão de Claisen, de três bocas, equipado com termômetro, condensador e rolha de borracha, por onde foram introduzidos 2,5 ml de DMSO, sob fluxo contínuo de nitrogênio. Esse sistema foi aquecido e deixado sob agitação, durante 12 horas, para dissolução do polissacarídeo.

Após resfriamento à temperatura ambiente, adicionou-se anion metil-sulfinil (0,025 equivalentes) em DMSO (0,7 ml de solução 1,8 M). Após a adição do anion o sistema foi agitado continuamente, sob atmosfera de nitrogênio, durante 12 horas. Após a formação do alcóxido, a solução foi resfriada à 20°C, em banho de gelo, e o iodeto de metila (3 ml) foi adicionado lentamente, sob agitação, não permitindo que a temperatura ultrapassasse 25°C. Em seguida, a mistura reagente foi dialisada em água corrente (12 horas). O dialisado foi submetido a várias extrações com clorofórmio, secado com sulfato de sódio anidro e evaporado a vácuo, até *secura*. Esse processo de metilação foi repetido duas vezes.

HIDRÓLISE, REDUÇÃO E ACETILAÇÃO DO POLISSACARÍDEO METILADO

O polissacarídeo metilado (7,5 ml) foi pré-hidrolizado com HCOOH 90% (4,5 ml), à 100°C, durante duas horas. A mistura foi resfriada e concentrada até xarope, sob pressão reduzida. O xarope foi hidrolisado com H₂SO₄ 0,25M à 98°C, em banho de água fervente, durante 14 horas. O hidrolisado foi neutralizado pela adição de carbonato de bário, centrifugado e o resíduo lavado com água. Os sobrenadantes reunidos foram reduzidos com boroidreto de sódio e analisados por G.L.C. (colunas A e B), na forma de alditóis acetato, parcialmente metilados (31) (Tabela VI).

OXIDAÇÃO COM PERIODATO

A amostra polissacarídica, após Sevag, (62mg) foi submetida à oxidação com periodato de sódio (0,05M, 10 ml) na ausência de luz, durante 50 horas à temperatura de 4°C (61, 82). Em paralelo foi feito um branco, nas mesmas condições. A determinados intervalos de tempo foram retiradas alíquotas (1 ml) da mistura oxidante e do branco, para a determinação de periodato, pelo método do arsenito de sódio (73), traçando-se a curva de consumo de IO₄⁻ contra tempo (48). O consumo real de periodato foi obtido pela extrapolação para o

tempo zero (112) (Figura 8).

Após 72 horas de oxidação, a mistura oxidante foi tratada com excesso de etileno-glicol (1 ml) para decompor o periodato remanescente. Em seguida, a solução foi dialisada, reduzida com boroidreto de sódio, hidrolisada e analisada por G.L.C., na forma de alditóis acetato, na coluna B (Tabela VII).

DEGRADAÇÃO TIPO SMITH

O polissacarídeo (100 mg) foi submetido a três sucessivas degradações tipo Smith (1,83), a qual consiste na oxidação com o periodato, redução com boroidreto e hidrólise suave com HCl 0,5 N (10 ml) à temperatura ambiente, durante 24 horas. Em seguida, os produtos degradados foram dialisados, recolhendo-se para análise os componentes dialisáveis e os não dialisáveis. O HCl da fração dializável foi removido por evaporação à vácuo, a 30-40°C. Os componentes dializáveis e os não dializáveis foram analisados por G.L.C., na forma de alditóis acetato, na coluna A (Tabela VIII).

METILAÇÃO DO POLISSACARÍDEO OBTIDO DAS DEGRADAÇÕES TIPO SMITH

O polissacarídeo resistente a três sucessivas degradação tipo Smith (30 mg) foi metilado pelo método de HAKOMORI (2 x). Após hidrólise ácida total, os açúcares parcialmente metilados foram analisados por G.L.C. (coluna B), na forma de alditóis acetato (Tabela IX).

DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE

Soluções aquosas contendo, respectivamente, 0,43, 0,86 e 1,28 g% de mucilagem foram ensaiadas em viscosímetro de Ostwald, para a determinação da viscosidade intrínseca (72, 103, 108, 132). A viscosidade reduzida (108, 132) foi determinada utilizando-se a solução contendo 0,43g% de mucilagem. Essa mesma solução foi, ainda, analisada adicionando-se eletrólitos em diferentes molaridades, a diferentes temperaturas e com variação de pH (Figuras 9-13).

DETERMINAÇÃO DA OSMOLARIDADE

Soluções aquosas de mucilagem de *Pereskia aculeata*

contendo 0,225; 0,30; 0,45; 0,60; 0,90; 1,20 e 1,80 g% de açúcar total, após a deionização da amostra em coluna de resina Dowex 50W-X8, forma H⁺ (200-400 mesh), foram utilizadas para a determinação da osmolaridade (70, 103, 108), em aparelho Osmette Precision Osmometer (Precision Systems, modelo 2007, série 1143).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de tratamento das folhas verdes de *Pereskia aculeata* (230,77g), primeiramente com etanol, depois com acetona e, do pó das mesmas, com benzeno: etanol (2:1, v/v) em aparelho de Soxhlet, teve por finalidade a remoção de água, pigmentos, ceras vegetais, lipídeos e açúcares livres. fato, também, observado por WOLFROM & PATIN (140) para o grão de café. Após esse tratamento o resíduo foi seco à temperatura ambiente e o material assim obtido (30,00g), com um rendimento de 13% a partir das folhas verdes, serviu de fonte para a extração da mucilagem.

A extração foi feita diretamente com água, em banho-maria à 85°C, com agitação mecânica. O volume de água adicionado foi considerado levando-se em conta o grau de inchamento e a solubilização do pó (200 ml/10g de pó). O processo de extração foi repetido mais duas vezes. O método de isolamento empregado é um processo reprodutível, que permite a extração de arabinogalactanas com bom rendimento. A mucilagem obtida foi completamente solúvel em água, de modo que a simples extração com água foi suficiente, tal como se observou em outros materiais de mesma natureza (17, 26, 49, 54, 68, 109, 133, 136, 140-141).

A precipitação da mucilagem da solução altamente viscosa foi feita com etanol (26, 53, 128), obtendo-se 5,92g de mucilagem, com um rendimento de 19,7% a partir do pó tratado com benzeno-etanol e 2,13% a partir das folhas verdes.

Os dados da Tabela I indicam que a mucilagem obtida da precipitação com etanol é composta de açúcares e proteínas, contendo, ainda, grupos O-acetil, O-fosfato e íons cálcio, entre as substâncias identificadas. Os grupos O-acetil e O-fosfato foram, também, confirmados, respectivamente, pelas bandas de absorção em 1240 e 1050 cm^{-1} (20) no espectro do infra-vermelho da mucilagem, após Sevag (Figura 6).

Tabela I - DADOS ANALÍTICOS DA MUCILAGEM EXTRAÍDA DE FOLHAS DE *Pereskia aculeata*.

	Antes Sevag	Após Sevag
Açúcar total (%)	41,00	36,00
Nitrogênio (%)	2,44	0,56
Proteínas (%)	15,25	3,50
Hexosaminas (%)	0	0
Acetil (%)	7,52	6,72
Metoxil (%)	0	0
Cálcio (%)	2,56	1,91
Fosfato (%)	0,51	0,48
Sulfato (%)	0	0
$[\alpha]_D^{25}$	n.d*	-29,4
Viscosidade intrínseca $[\mu] ; (ml/g) (10^2)$	n.d*	7,9
Peso molecular (10^6)	n.d*	<2,0
Peso equivalente (10^3)	~1,467	1,955
Umidade (%)	4,7	n.d*
Cinzas (%)	3,63	n.d*

n.d*, não determinado

A análise cromatográfica, por C.P. e T.L.C., dos açúcares obtidos pela hidrólise ácida total, indicou a presença de arabinose, galactose, ramnose, além de vestígios de outros açúcares (não mostrada em figuras).

Após hidrólise ácida parcial com TFA 1N (4h em banho de água fervente) e aplicação em coluna de resina Dowex AG1-X10, forma acetato, a análise por C.P. dos açúcares ácidos eluídos com ácido acético à 30%, indicou a presença de ácido-D-galacturônico e oligossacarídeos ácidos, conforme a figura I.

A determinação de ácido urônico indicou 12% em relação ao polissacarídeo total (Tabela II).

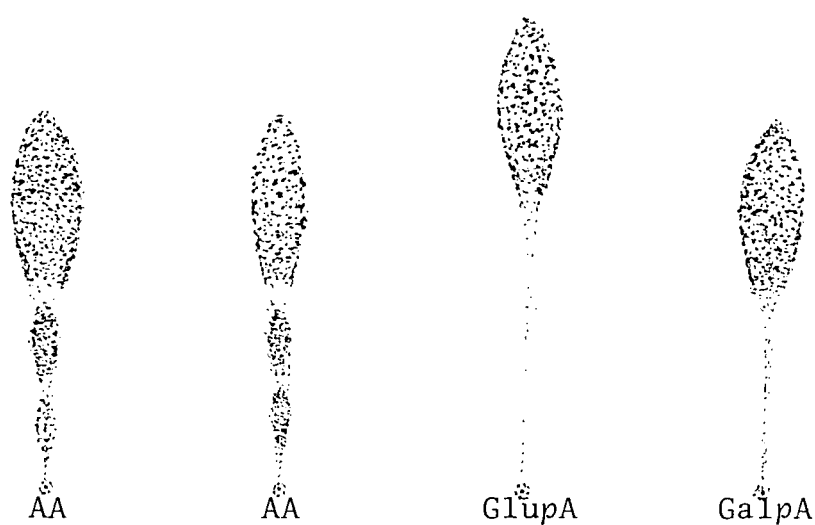


Figura 1: Análise por C.P. da fração AA do polissacarídeo componente da mucilagem de folhas de *P. aculeata*.

A relação quantitativa dos açúcares neutros por G.L. C., na forma de alditóis acetato, inscritos na tabela II, indicou a presença de galactose, arabinose, ramnose, além de glucose, manose, fucose, xilose e ribose em pequenas proporções. Encontrou-se, ainda, 2,1% de mio-inositol calculado em relação do total de açúcares neutros.

Tabela II - COMPOSIÇÃO EM MONOSSACARÍDEOS DETERMINADA POR G.L.C.^a NA FORMA DE ALDITÓIS ACETATO, DA MUCILAGEM DE FOLHAS DE *P. aculeata*.

Polissacarídeo	% dos componentes									
	Rha	Fuc	Rib	Ara	Xil	Man	Gal	Glu	mio-ino ^b	Ácido urônico ^c
Antes Sevag	8,0	2,8	2,4	22,0	2,6	2,8	44,6	2,8	2,1	12,0
Após Sevag	9,2	2,5	2,5	27,5	2,5	3,0	40,8	3,0	4,2	9,0

^a nas colunas A e B;

^b relativo a um padrão autêntico de mio-inositol-hexa-O-acetato e calculado em relação ao total de açúcar neutro;

^c dosado pelo método do carbazol.

Os resultados obtidos por cromatografia gasosa serviram para definir o polissacarídeo como uma arabinogalactana cuja relação Rha: Ara: Gal: ácido urônico é 1: 2,75: 5,58: 1,5.

O polissacarídeo foi considerado livre de açúcar aminado, consoante os resultados da Tabela I.

No presente trabalho, a precipitação de 1,27 g de material foi efetuada em pH 7,0, observando-se uma recuperação de 1,26g de material ácido (85), com um rendimento de 99,7%. O precipitado formado imediatamente após a adição da solução de cetavlon indicou, também, que o polissacarídeo tem um peso molecular alto, uma vez que segundo SCOTT (118), os de baixo peso molecular, com baixa densidade de carga, as vezes, necessitam de um período relativamente maior para que ocorra tal fracionamento. Outras arabinogalactanas precipitadas pelo mesmo processo foram encontradas em gomas e mucilagens (14, 26, 105).

A precipitação de polianions de soluções aquosas por meio de uma grande variedade de cátions é conhecida a bastante tempo (119) e foi inicialmente observada, por KUHN & BIELIG na reação de precipitação de proteínas com detergentes contendo íons de amônio quaternário. JONES (91) preparou o ácido nucleico por meio do complexo insolúvel de cetiltrimetilamônio e salientou que o alginato e outros polianions carboxílicos, também formariam precipitados insolúveis. Assim, os polissacarídeos neutros não precipitam com detergente, em pH 7,0.

A análise qualitativa de aminoácidos, do polissacarídeos antes Sevag, (não mostrada em figura), confirmou os dados obtidos por DAYRELL & VIEIRA, que trabalharam com o concentrado de folhas do mesmo vegetal (55).

No processo de purificação com a mistura de butanol e clorofórmio (53), a finalidade precípua foi a remoção de proteínas livres pelo método utilizado por Sevag, modificado por STAUB (129). Conforme a tabela I, o conteúdo proteído de 15,25% na amostra original passou para 3,50%, após oito tratamentos sucessivos. Observou-se, ainda, um decréscimo de açúcar total, de cálcio e de grupos O-acetil e O-fosfato.

Os íons de cálcio ocorrem normalmente, salificando materiais pécnicos (130) e fitoglicolipídeos. É o íon que mais se complexa com o inositol (40). Como a mucilagem de *Pereskia aculeata* é formada por um polissacarídeo ácido que contém inositol, justifica-se a presença desse íon. Quanto ao seu decréscimo, pode estar relacionado ao do ácido urônico e ao do fosfato, desde que os seus percentuais também descreceram após o tratamento de Sevag, conforme indicam as tabelas I e II.

A hidrólise ácida do polissacarídeo desproteïnizado e posterior análise por G.L.C., na forma de derivados acetilados, mostrou a composição em monossacarídeos e mio-inositol, cujos resultados estão indicados na tabela II.

A relação Rha: Ara: Gal: ácido urônico após Sevag, é de 1,00: 2,99: 4,43: 0,98, conforme se verifica pelo percentual de cada componente.

A presença de proteína remanescente, mesmo após oito tratamentos desproteïnizantes de Sevag, é um indício de que a mucilagem de *Pereskia aculeata*, seja constituída

por uma peptídeo-glicana (46), o que posteriormente deverá ser comprovado pela determinação de ligação O-glicosídica entre a parte proteica e a cadeia glicídica.

A determinação de fosfato e inositol, em proporção de 1: 1,5, leva a supor que a mucilagem extraída de folhas de *Pereskia aculeata* esteja associada a um lipídeo, como em fitoglicolipídeos, visto que os resultados da tabela I mostram que somente 49% do material foi identificado no total da amostra. No caso de um fitoglicolipídeo, o inositol serviria como uma ponte de ligação entre a cadeia lipídica e a cadeia de açúcares, o que foi observado em materiais extraídos de vegetais superiores e de paredes de fungos (27, 37-42, 59, 99-100). Assim, não fica excluída a hipótese de que esse material possa se tratar de um complexo glicolipídeo-proteína (114)

O mio-inositol, isolado por SCHERER em 1850, tem sua importância como um fator essencial de crescimento de células humanas em cultura de tecidos, tanto para as células normais como para as malignas (65). Quando associado à galactose, manose ou glucose, no primeiro caso constituindo o galactimol (59), é importante por fazer parte da estrutura de vários antibióticos (79). É, também, encontrado em *Brassica campestris*, de onde foi isolado ligado a um dissacarídeo de galactose (123).

O dado de polarimetria $[\alpha]_D^{25} -29,4$ (c 0,1542, água) para o polissacarídeo desproteínizado (tabela I), com valor negativo de rotação óptica, indica que o polímero apresenta-se, provavelmente, na configuração β . Essa configuração, também, foi encontrada em outras arabinogalactanas de gomas, material péctico e e mucilagens (46).

O polissacarídeo, ao ser submetido a eletroforese em fitas de acetato celulose, mostrou a presença de única banda, embora difusa. Por outro lado, ao ser analisado por filtração em gel de Sephadex G-100 e G-200 (1:1), o polissacarídeo apresentou um único pico simétrico, conforme mostra a figura 2. A mistura em partes iguais dos géis de Sephadex teve por objetivo alcançar-se um melhor desempenho na velocidade de escoamento do eluato.

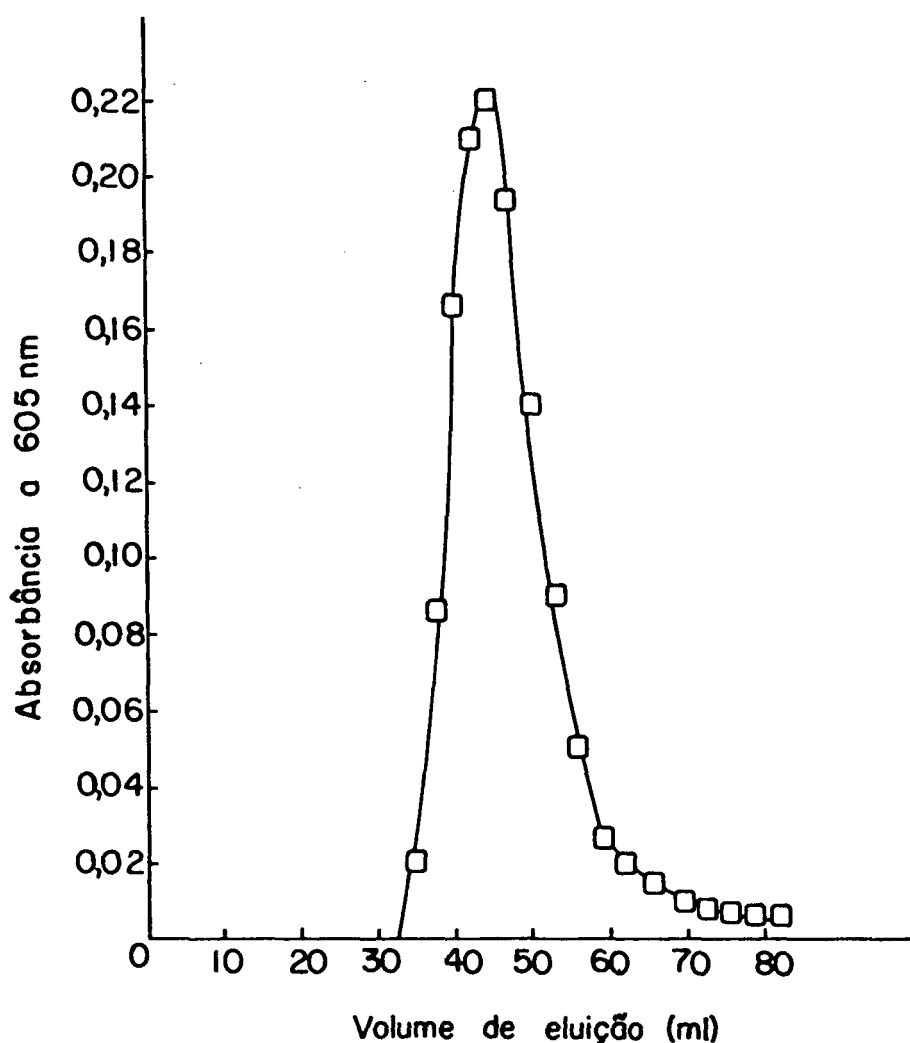


FIGURA 2 - Filtração em gel do polissacarídeo colorido com azul de Procion M-3G.

A cromatografia foi realizada em coluna contendo a mistura de Sephadex G-100 e G-200 (1:1) (40 x 2,0 cm, d.i.). As frações de 2,5 ml foram coletadas à temperatura ambiente (coletor automático de frações Büchler Instruments), com velocidade de escoamento de 2,5 ml/hora. As absorbâncias de cada fração foram efetuadas à 605 nm. O polissacarídeo foi eluído nos volumes de 32,5 a 82,5 ml de eluato, com pico máximo no volume de 42,5 ml. O pico máximo de eluição do Blue Dextran foi de 35 ml.

A filtração em gel de Sepharose 6B do polissacarídeo de *P. aculeata* apresentou um único pico simétrico, com volume de eluição um pouco superior ao do padrão de Blue Dextran (P. M. 2×10^6), conforme indica a figura 3.

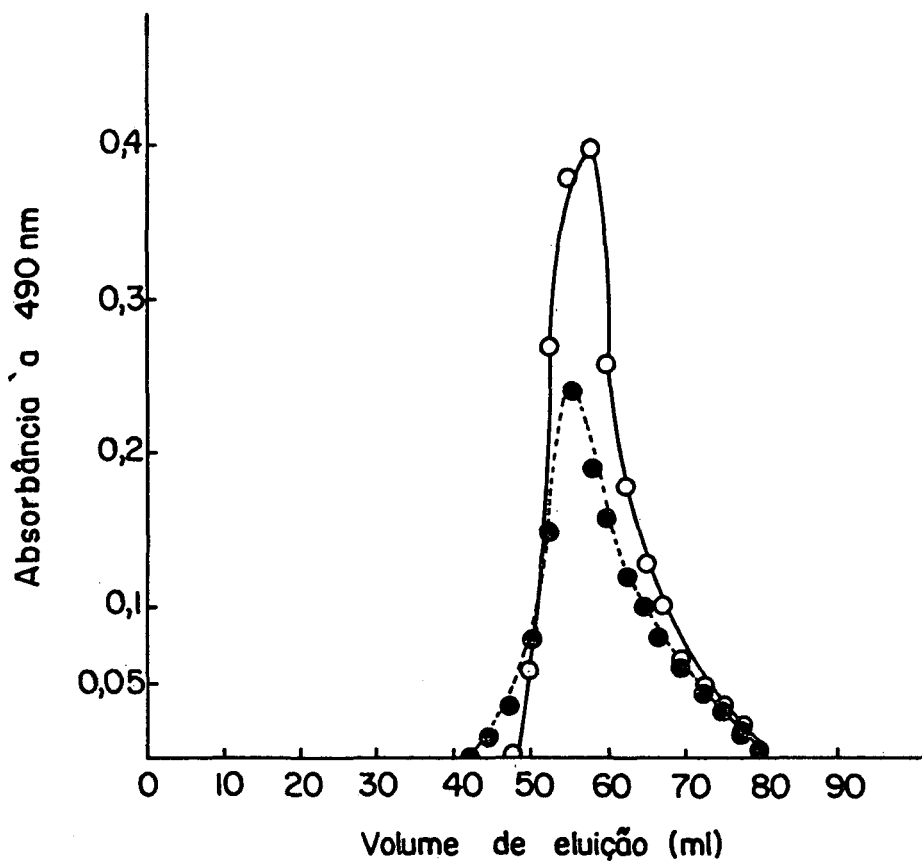


FIGURA 3 - Cromatografia em Sepharose 6B, eluída com tampão tris-HCl pH 7,2, 0,05M.

A coluna de gel (38,5 x 2,0 cm, d.i.) foi calibrada com Blue Dextran (●-●-●). As frações de 2,5 ml foram coletadas à temperatura ambiente (coletor automático de frações Büchler Instruments), com velocidade de fluxo de 1,25 ml/hora, e analisados pelo método do fenol-ácido sulfúrico.

Portanto, o P.M. da amostra deve ser inferior a 2×10^6 (134). Como existe a possibilidade de que o polímero forme agregados moleculares, é provável que o P.M. real seja bastante inferior (108).

Desse modo, de posse dos resultados obtidos por filtração em géis e eletroforese, quanto ao critério de homogeneidade, o material foi considerado apto para a análise de suas propriedades.

A avaliação da homogeneidade de arabinogalactanas

e de complexos arabinogalactanas-proteína é dificultada porque as preparações podem conter um espectro aparentemente contínuo de espécies moleculares, intrinsicamente relacionadas com outras macromoléculas quimicamente distintas. Assim, uma simples medida de peso molecular por cromatografia, nem sempre é adequada para assegurar o critério de homogeneidade da amostra (9).

O sucesso dos procedimentos de purificação têm sido assegurados pelo baixo conteúdo de nitrogênio do material. Aproveitando a idéia de JONES & SMITH (92), que há 27 anos atrás sugeriram que o nitrogênio das gomas de plantas poderia estar relacionado com seu programa biossintético, as proteínas podem estar associadas à celulose, ao glicogênio e são consideradas como "primer", presentes em muitos sítios de iniciação da glicosilação e crescimento da cadeia polissacarídica (46).

O estudo da hidrólise ácida controlada apresenta os resultados indicados na tabela III.

Tabela III - ANÁLISE DAS FRAÇÕES RESULTANTES DA HIDRÓLISE PARCIAL DO POLISSACARÍDEO COMPONENTE DA MUCILAGEM DE FOLHAS DE *Pereskia aculeata*.

Frações ^a	% dos componentes ^b							
	Rha	Fuc	Rib	Ara	Xil	Man	Gal	Glu
S ₁	1,70	3,00	0	70,70	3,00	0	22,00	0
S ₂	22,00	4,70	0	47,70	9,60	0	16,00	0
S ₃	8,80	traços	0	29,80	3,00	0	54,00	4,40
S ₄	0	0	0	100,00	0	0	0	0
P ₄	3,50	0	4,50	86,00	0	6,00	traços	0

^a a hidrólise ácida do polissacarídeo foi feita com ácido sulfúrico 0,05N em banho de água fervente, durante 35 min. Ao hidrolisado foi adicionado etanol suficiente para dar uma concentração final de 85%, obtendo-se um precipitado e um sobrenadante separados por centrifugação e denominados de frações P₁ e S₁, respectivamente. A fração P₁ foi novamente hidrolisada, nas mesmas condições acima referidas, obtendo-se a fração S₂, e na sequência S₃, S₄ e P₄;

^b analisados por G.L.C., na forma de alditóis acetato, na coluna A.

A facilidade com que as unidades de galactose e arabinose foram liberadas na hidrólise ácida, em condições suaves, é um indício de que esses açúcares ocorrem na forma furanosídica, como se verifica para as unidades de arabinose em gomas, pectinas e mucilagens (46).

Por outro lado, estudos de hidrólise parcial têm sugerido, também, a possibilidade da presença de galactofuranoses nesses materiais (34, 35, 93). Esse tipo de conformação, tanto para a arabinose como para a galactose, foi posteriormente confirmada na análise dos produtos de metilação do polissacarídeo (Tabela VI). A presença de ramnose em quase todas as frações da tabela III, pode ser explicada pela relativa susceptibilidade dessas unidades à hidrólise ácida (25, 26, 127, 133), o mesmo ocorrendo com as unidades de xilose, quando em posição terminal (3, 6, 10, 14, 15, 21, 105, 133, 138). A presença de arabinose e traços de galactose resistentes a quatro sucessivas hidrólises suaves observada na fração P₄, sugere a presença de formas piranosídicas para essas unidades. Quanto à ribose, pode ser oriunda de uma contaminação por ácido nucleico. A ramnose resistente pode ser atribuída à sua ligação ao ácido urônico, formando ácido aldobiurônico. Isso pode ser confirmado verificando-se os dados de metilação (Tabela VI), onde se observa a ausência do derivado tetrametilado de galactopiranoose. Esse derivado, todavia, encontra-se presente entre os alditóis acetato parcialmente metilados da fração AA, carboxi-reduzidos e permetilados, conforme indica a tabela V. Entre os produtos de metilação do polissacarídeo residual de três degradações tipo Smith sequenciadas (Tabela IX) encontrou-se o derivado 2,4 di-O-metil ramnitol, ausente no polissacarídeo antes da oxidação (Tabela VI). Isso sugere que no polissacarídeo após Sevag, a posição C-2 da ramnose poderia estar bloqueada pelo ácido-D-galacturônico.

O produto da hidrólise do polissacarídeo com T.F.A. foi aplicado a uma coluna de resina AG1-X10, forma acetato. Os açúcares neutros (AN) e os ácidos (AA) foram eluídos, respectivamente, com água e com solução de ácido acético à 30%. A análise da fração neutra, conforme indica a tabela IV, revelou que a me

ma é constituída por galactose, arabinose, ramnose, glucose, mio-inositol, além de traços de xilose e manose. Essa fração mostrou-se isenta de fosfato. A fração de açúcares ácidos, após carboxi-redução, hidrólise, redução e análise por G.L.C., na forma de alditóis acetato, indicou que praticamente todo o mio-inositol, bem como o fosfato, esse último calculado colorimetricamente, são constituintes dessa fração.

Tabela IV - COMPOSIÇÃO DAS FRAÇÕES NEUTRA (AN) E ÁCIDA (AA), SEPARADAS EM COLUNA DE RESINA AG1-X10 (AcO⁻), RESULTANTES DA HIDRÓLISE DO POLISSACARÍDEO, COMPONENTES DA MUCILAGEM DE FOLHAS DE *P. aculeata*, COM T.F.A. E ANALISADOS POR G.L.C., NA FORMA DE ALDITÓIS ACETATO.

Frações	% dos monossacarídeos ^a								mio-inositol ^c	PO ₄ ^{-c}
	Rha	Fuc	Rib	Ara	Xil	Man	Gal	Glu		
AN	3,00	0	0	23,00	0	0	35,00	3,00	2,75	-
AA ^b	7,00	2,00	2,00	7,00	2,00	2,00	14,00	-	68,65	0,46

^a analisados na coluna B;

^b carboxi-reduzido, hidrolisado, novamente reduzido e acetilado;

^c % calculada em relação ao açúcar total.

O espectro de absorção pelo infra-vermelho do mio-inositol, isolado por T.L.C. preparativa da amostra da fração AA acetilada, mostrou bandas de absorção idênticas às de um padrão autêntico, preparado nas mesmas condições, conforme indicam as figuras 4 e 5, respectivamente.

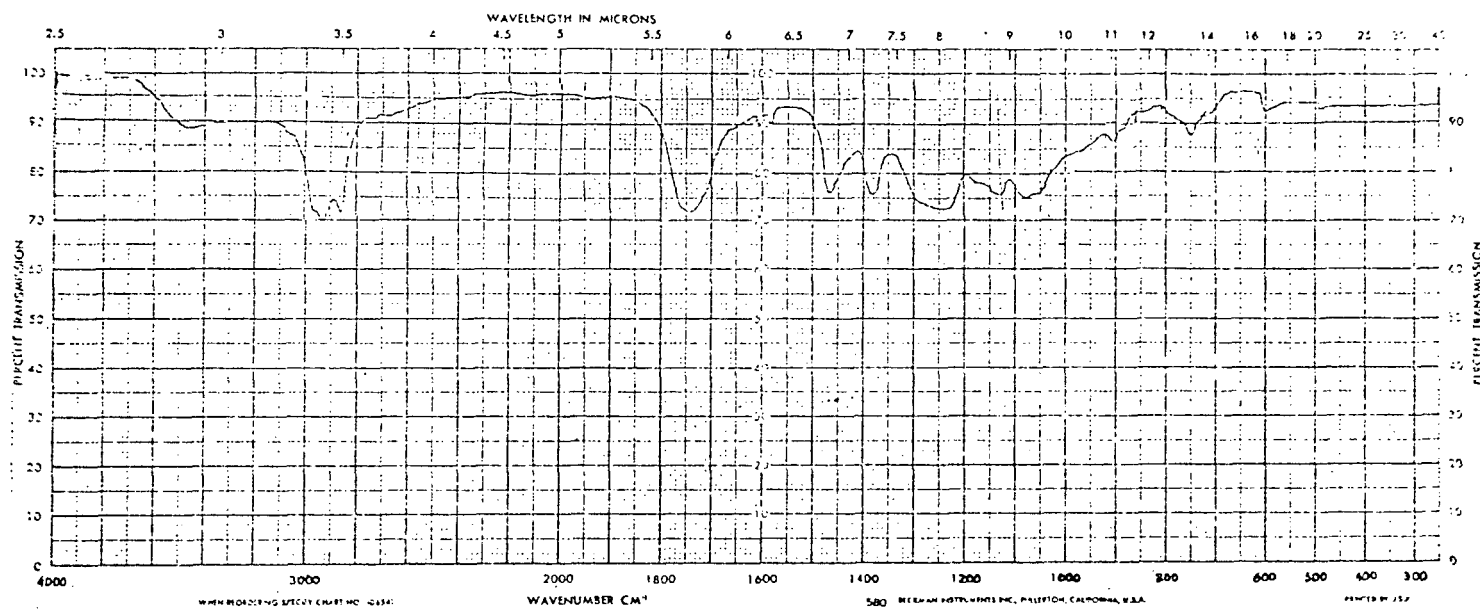


FIGURA 4 - Espectro de absorção no infra-vermelho do mio-inositol acetilado, isolado por cromatografia preparativa, da fração AA, da mucilagem de folhas de *P. aculeata*.

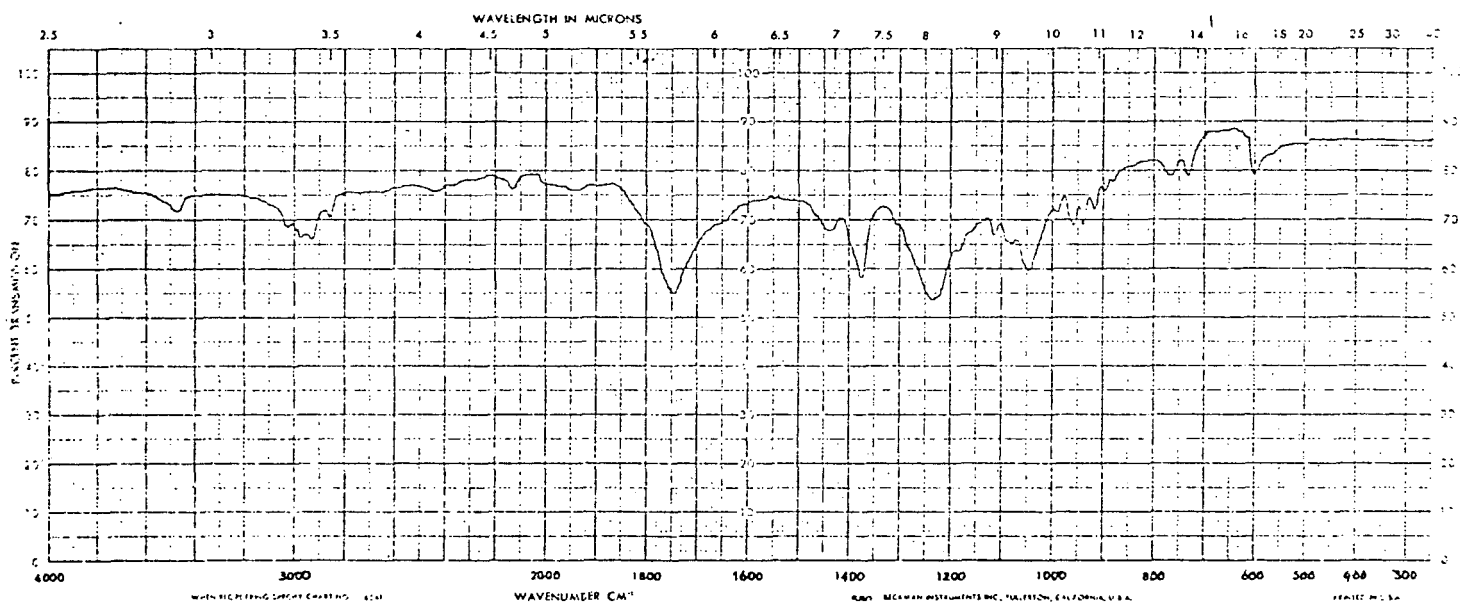


FIGURA 5 - Espectro de absorção no infra-vermelho de um padrão autêntico de mio-inositol hexa-O-acetato.

Em preparações onde se constatou a existência de fi toglicolipídeos, foi observado que o inositol serve como ponte de ligação entre o fosfato e o ácido urônico, ao qual se ligam os açúcares neutros (37-42, 94, 100).

A presença de grandes quantidades de ramnose na fração AA é mais um indício de que esse açúcar encontra-se ligado ao ácido D-galacturônico, a semelhança do que ocorre em materiais pecticos (10, 16, 17, 26, 50, 105, 111, 130, 133). Detectou-se, também, proporção elevada de arabinose, bem como menores proporções de fucose, ribose, xilose e manose como constituintes dessa fração, formando mistura de aldobiurônicos e oligossacarídeos ácidos de P.M. mais elevado.

Os oligossacarídeos ácidos foram metilados, carboxi reduzidos e permetilados. Os produtos da hidrólise ácida total foram analisados por G.L.C., na forma de alditóis acetato, parcialmente metilados, conforme indica a tabela V.

Verificou-se nesses resultados a presença de 2,3,4,6-tetra-O-metil galactitol, de 3,4 di-O-metil ramnitol e de 2,3,6 tri-O-metil galactitol, sugerindo a possibilidade de ligação glicosídica alternada do tipo (1 → 2) entre as unidades do ácido D-galacturônico e a ramnose, e de ligação (1 → 4) entre a ramnose e o ácido-D-galacturônico. Há, ainda, a possibilidade de ligação glicosídica (1 → 3) entre as unidades de ramnose, envolvidas com o ácido-D-galacturônico, através de C-2, tendo em vista a presença do derivado 4 mono-O-metil ramnitol (Tabela V). Isso foi confirmado na metilação do polissacarídeo residual de três sucessivas degradações de Smith controladas (Tabela IX) na qual, entre os produtos, foi identificado por G.L.C., o 2,4 di-O-metil ramnitol.

Tabela V - ANÁLISE DA FRAÇÃO DE AÇUCARES ÁCIDOS METILADOS, CARBOXI-REDUZIDOS, PERMETILADOS E ANALISADOS POR G.L.C., DA MUCILAGEM DE FOLHAS DE *P. aculeata*.

Alditóis acetato	T*		%	
	Coluna A	Coluna B	Coluna A	Coluna B
2,3,5 tri-O-metil arabinitol	0,55	0,42	13,00	13,00
2,3,4 tri-O-metil xilitol	0,70	0,50	5,00	5,00
2,3,4 tri-O-metil fucositol	0,70	0,54	5,00	5,00
3,5 di-O-metil ribitol	0,81	0,71	5,00	5,00
3,4 di-O-metil rammitol	0,89	0,86	9,00	9,00
2,3 di-O-metil arabinitol	1,20	1,04	8,00	8,00
2,3,4,6 tetra-O-metil-galactitol	1,30	1,16	14,00	14,00
4 mono-O-metil rammitol	1,76	1,50	13,00	13,00
2,3,6 tri-O-metil galactitol	2,57	2,18	9,00	9,00
2,6 di-O-metil galactitol	3,77	3,18	8,00	8,00
3,6 di-O-metil manitol	4,36	3,44	5,00	5,00
2,3 di-O-metil galactitol	5,64	4,62	6,00	6,00

* tempo de retenção relativo ao 1,5 di-O-acetil 2,3,4,6 tetra-O-metil-D-glucitol.

Os açúcares que aparecem como traços no polissacarídeo e concentram-se na fração ácida, apresentam T em G.L.C. semelhantes ao 2,3,4 tri-O-metil fucositol, 3,5, di-O-metil ribitol, 2,3,4 tri-O-metil xilitol e 2,6 di-O-metil manitol. A identificação dos derivados 2,3,6 tri-O-metil galactitol e 2,3 di-O-metil galactitol, nessa fração de oligossacarídeos ácidos, pode ser atribuída a fragmentos contendo unidades de galactopirranose, substituídas em C-4 e C-6.

A complexidade estrutural desse polissacarídeo pode ser observada pelos dados de metilação (Tabela VI) que mostram determinados derivados metilados que fazem parte de ramificações no polímero. Os tempos de retenção foram comparados com os obtidos por LINDBERG e por FÁBIO et al. (101, 67), e alguns desses derivados já foram isolados de arabinogalactanas de substâncias pecticas e de gomas (5, 7-10, 14, 15-17, 21, 26, 50, 105, 127, 130, 133).

Tabela VI - ANÁLISE POR G.L.C., DOS ALDITÓIS ACETATO PARCIALMENTE METILADO DO POLISSACARÍDEO COMPONENTE DA MUCILAGEM DE FOLHAS DE *P. aculeata*, APÓS SEVAG.

Alditóis acetato	T [*]		%	
	Coluna A	Coluna B	Coluna A	Coluna B
2,3,5 tri-O-metil arabinitol	0,41	0,42	12,50	12,50
2,3,4 tri-O-metil xilitol	0,61	0,50	3,00	3,00
2,3,4 tri-O-metil fucositol	0,61	0,60	3,00	3,00
3,5 di-O-metil ribitol	0,77	0,75	3,00	3,00
3,4 di-O-metil ramnitol	0,85	0,87	6,00	6,00
2,5 di-O-metil arabinitol	1,00	0,99	6,50	6,50
2,3,5,6 tetra-O-metil galactitol	1,14	1,04	11,00	11,00
2,3 di-O-metil arabinitol	1,34	1,31	3,00	3,00
3,4 di-O-metil arabinitol	1,34	1,31	3,00	3,00
4 mono-O-metil ramnitol	1,69	1,53	4,50	4,50
2,4,6 tri-O-metil glucitol	1,96	1,83	3,00	3,00
2,3,6 tri-O-metil galactitol	2,46	2,26	4,00	4,00
3,6 di-O-metil galactitol	4,43	2,59	9,00	9,00
2,3,5 tri-O-metil galactitol	3,15	2,80	9,00	9,00
2,6 di-O-metil galactitol	3,65	3,16	3,00	3,00
2,3,4 tri-O-metil galactitol	3,65	2,80	4,50	4,50
2,5 di-O-metil galactitol	3,85	2,26	9,00	9,00
3,6 di-O-metil manitol	4,24	3,55	3,00	3,00
2,3 di-O-metil galactitol	5,81	4,50	3,00	3,00
? ^{**}	7,64		1,00	
? ^{**}		7,59		0,73
? ^{**}		9,30		1,03
? ^{**}		11,60		4,27

* tempo de retenção relativo ao 1,5-di-O-acetil 2,3,4,6 tetra-O-metil-D-glucitol;

**

calculado em relação ao total de açúcares.

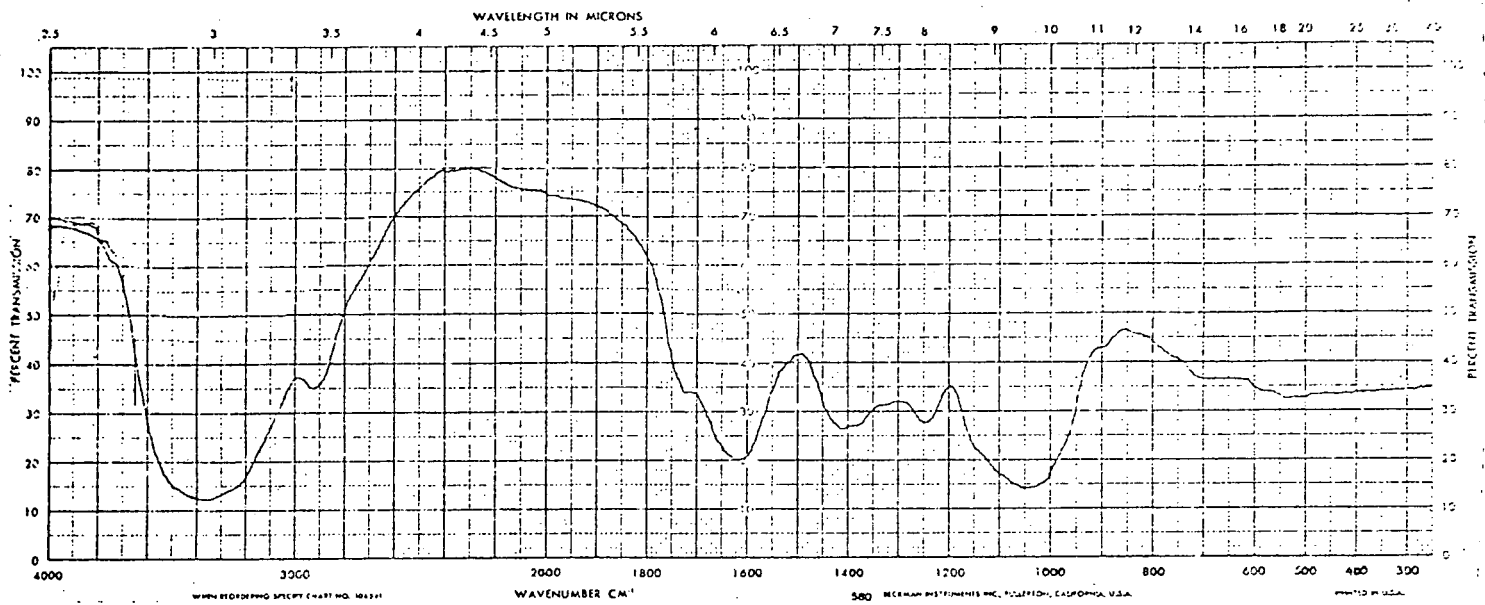


FIGURA 6 - Espectro de absorção no infra-vermelho, do polissacárido, não metilado, componente da mucilagem de folhas de *P. aculeata*.

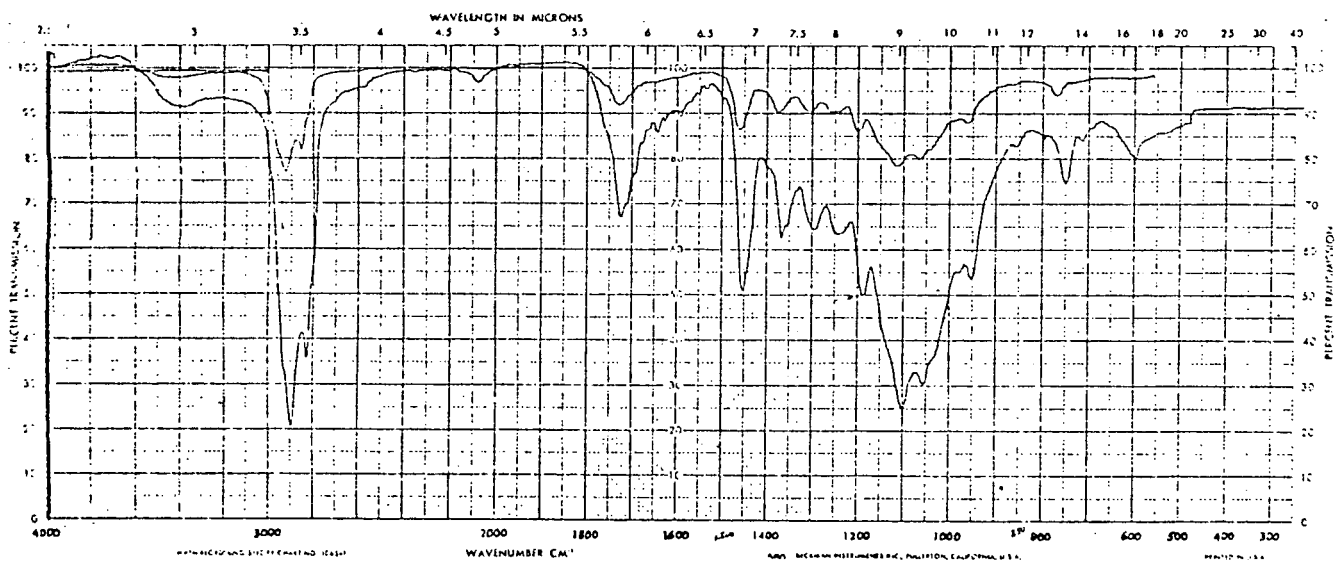


FIGURA 7 - Espectro de absorção no infra-vermelho, do polissacárido componente da mucilagem de folhas de *P. aculeata*, após metilação.

A presença dos derivados 2,3,5,6 tetra-O-metil galactitol, 2,3,5 tri-O-metil arabinitol, 2,3,4 tri-O-metil xilitol, 2,3,4 tri-O-metil fucositol, indica que essas unidades de monossacarídeos (23%) ocorrem como terminais não redutores. Verifica-se, ainda, que as unidades de arabinofuranose encontram-se, provavelmente, ligadas através (1 →3) e (1 →5), consoante a presença de 2,5 di-O-metil arabinitol e 2,3 di-O-metil arabinitol, tal como ocorre em gomas, pectinas e mucilagens (46). Por outro lado, a ausência de derivados mono-O-metil arabinitol, exclui a possibilidade de ramificações entre essas unidades de açúcar. O derivado 3,4 di-O-metil arabinitol pode ser resultante de unidades de arabinopiranosose substituídas em C-2. O elevado teor de 2,3,5 tri-O-metil galactitol e de 2,5 di-O-metil galactitol confirma a presença de unidades de galactofuranose nesse polímero, interligadas através (1 →6) na cadeia principal, substituídas em C-3 ou vice-versa. A presença de 2,6 di-O-metil galactitol e de 3,6 di-O-metil galactitol sugere que unidades de galactofuranose estejam ligadas através (1 →5), com substituição em C-3 e C-2.

A possibilidade de formas furanosídicas, anteriormente sugerida pela hidrólise controlada (Tabela III), também, está apoiada nos resultados obtidos pela análise com a galactose oxidase; onde do total de aproximadamente 46% de unidades de galactose, foram identificadas 8,70% de forma piranosídica, com C-6 livre. Isso está coerente com a identificação do derivado 2,3,6 tri-O-metil galactitol (Tabela VI) que sugere ligação do tipo (1 →4) entre essas unidades de açúcar. O mesmo tipo de ligação pode ocorrer com o derivado 2,3 di-O-metil galactitol, que possui substituição em C-6, enquanto o derivado 2,3,4 tri-O-metil galactitol sugere ligação (1 →6) entre as unidades de galactopiranosose. Assim, do total de 46% das unidades de galactose, 25% correspondem à galp. A possibilidade de contaminação por um glucano associado a celulose, não fica excluída devido à presença de 2,4,6 tri-O-metil glucitol (14, 80, 95, 138, 140).

Em parede de fungos têm sido relatada a presença de galactofuranose ligadas β -(1 →5), com substituição em C-2 ou C-3 (75). Galactofuranose como extremidade não redutora, ligada a

um manano, tem sido relatada em paredes de fungos de bactérias e em protozoário (19, 28-29, 43, 71, 76, 95).

Uma possível implicação fisiológica, decorrente desse tipo de conformação, seria a de atuar como um sinal capaz de impedir o alongamento da cadeia durante a síntese do polímero, ajudando a controlar sua forma e tamanho. Também, pode servir, como barreira contra o ataque enzimático de exoglicanases do meio ambiente (19).

A presença de elevados teores de derivados dimetilados indica uma estrutura bastante ramificada para a arabinogalactana, muito mais para as unidades de galactose do que para as de arabinose.

Na análise do espectro de absorção no infra-vermelho, a possibilidade de metilação incompleta ficou excluída pela ausência de absorção entre $3400-3600\text{ cm}^{-1}$ (20, 101) do polissacarídeo metilado, conforme mostram as figuras 6 e 7, respectivamente.

Na oxidação com periodato, a arabinogalactana apresentou um consumo de periodato e liberação de ácido fórmico (96), respectivamente de 1,22 e 0,62 moles por mol de açúcar anidro, conforme mostra a figura 8. Esses resultados foram calculados com base em amostra contendo apenas 36% de açúcar, conforme indica a tabela I. Observando-se os dados de metilação indicados na tabela VI, haveria um consumo de 0,74 moles de NaIO_4 e a liberação de 0,105 moles de ácido fórmico, por mol de açúcar anidro. O resultado anômalo obtido pode ser atribuído à presença de agliconas não identificadas, ligadas ao polissacarídeo, que poderiam, também, sofrer essa oxidação.

A análise por G.L.C. dos produtos da oxidação da arabinogalactana com periodato, na forma de alditóis acetato, indicada na tabela VII, são consistentes com uma estrutura complexa, altamente ramificada, e em boa concordância com os dados de metilação.

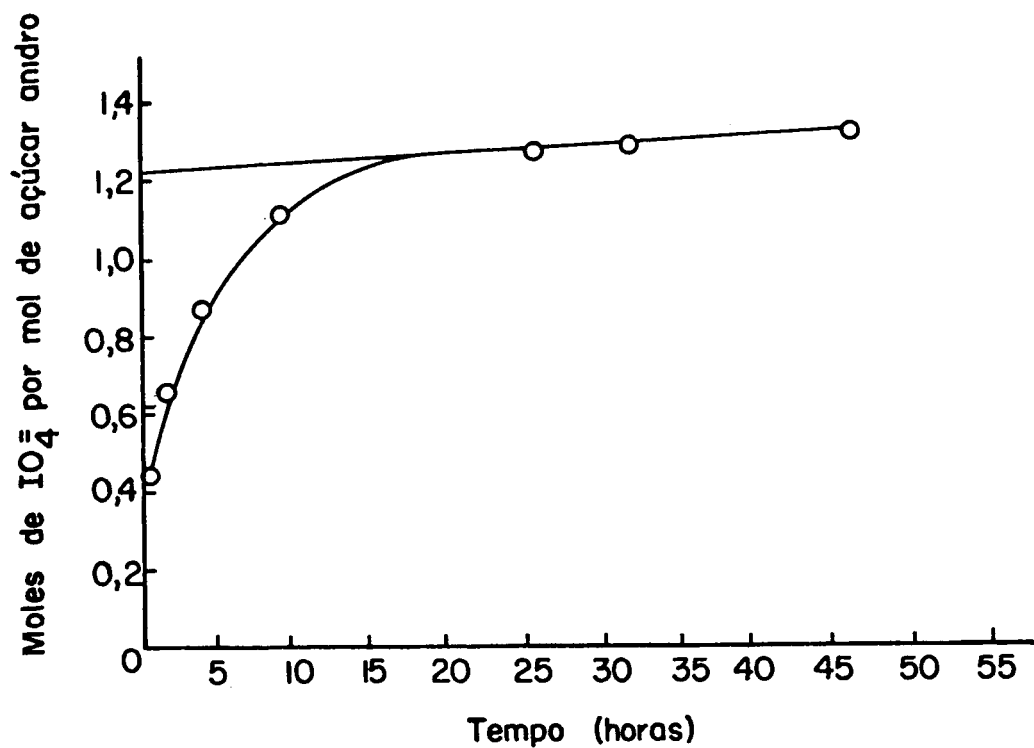


FIGURA 8 - Determinação do consumo de periodato pelo polissacarídeo componente da mucilagem de folhas de *P. aculeata*.

Uma amostra de polissacarídeo (62,0 mg) foi oxidado com periodato de sódio 0,05 M (10,0 ml) à temperatura de 4°C. A diferentes intervalos de tempo foram retiradas alíquotas de 1,0 ml para a determinação do consumo de periodato, pelo método de arsenito de sódio. Os resultados obtidos foram extrapolados para o tempo zero.

Tabela VII - ANÁLISE POR G.L.C., NA FORMA DE ALDITÓIS ACETATO
DOS PRODUTOS DA OXIDAÇÃO COM PERIODATO, DO POLISSACARÍDEO DA
MUCILAGEM DE FOLHAS DE *P. aculeata*.

Componentes prováveis	T ^z	%
Glicerol	0,068	3,50
Treitol + Eritritol	0,34	8,50
Ramnitol	0,72	17,50
Fucositol	0,78	traços
Ribitol	0,87	traços
Arabinitol	1,00	30,00
Manitol	3,00	traços
Galactitol	3,10	40,50
Glucitol	3,97	traços
mio-inositol ^{**}	4,10	0,54

* tempo de retenção relativo ao penta-O-acetil arabinitol e hexa-O-acetil mio-
inositol, coluna B.

**
calculado em relação ao total de açúcares.

O polissacarídeo foi submetido a três sucessivas de-
gradações tipo Smith, que resultou na formação de vários produ-
tos, os quais foram analisados por cromatografia em fase gasosa,
na forma de alditóis acetato, conforme a tabela VIII.

A presença de mio-inositol resistente, mesmo após três
degradações, sugere bloqueio de suas hidroxilas vicinais. Os pro-
dutos obtidos em cada degradação são difíceis de serem interpre-
tados, uma vez que, ainda, não temos dados completos a respeito
de uma possível estrutura polissacarídica.

Tabela VIII - ANÁLISE POR G.L.C., NA FORMA DE ALDITÓIS ACETATO DOS PRODUTOS DE TRÊS DEGRADAÇÕES TIPO SMITH SEQUENCIADAS DO POLISSACARÍDEO, COMPONENTE DA MUCILAGEM DE FOLHAS DE *P. aculeata*.

Componentes	T*	%					
		1a.oxidação		2a.oxidação		3a.oxidação	
		Dial. ^a	N.Dial. ^b	Dial. ^a	N.Dial. ^b	Dial. ^a	N.Dial. ^b
Glicerol	0,05	7,50	4,00	30,50	4,00	11,00	10,00
Treitol + Eritritol	0,30	6,00	4,00	26,50	3,50	13,00	18,00
Ramnitol	0,53	9,00	11,00	10,50	21,00	18,00	25,00
Fucositol	0,64	0	2,50	8,00	0	0	0
Ribitol	0,77	0	2,50	4,00	0	0	traços
Arabinitol	1,00	57,00	30,00	11,50	30,00	32,00	20,00
Xilitol	1,47	2,00	2,00	0	1,50	11,50	0
Manitol	3,01	2,50	0	5,00	0	0	traços
Galactitol	3,64	20,50	42,00	4,00	37,00	15,00	27,00
Glucitol	4,19	0	2,00	0	3,00	0	traços
mio-inositol	4,51	7,50	4,00	20,00	2,80	23,00	3,00

* - tempo de retenção relativo ao pentá-O-acetil e hexa-O-acetil mio-inositol, coluna A.

** --- calculado em relação ao total de açúcares.

^a Dializável.

^b Não dializável.

O polímero resultante da última degradação foi analisado por metilação e seus metil alditóis acetato encontram-se indicados na Tabela IX. Os derivados metilados confirmam a presença de galactose resistente à oxidação com C-3 ou C-2 substituído, conforme verificado na metilação do polissacarídeo (Tabela VI). Essas unidades podem provir, provavelmente, de uma galactana furanosídica ligada (1 → 5), consoante a presença de elevados teores dos derivados 2,6 di-O-metil galactitol e 3,6 di-O-metil galactitol entre os produtos de metila-

lação. O derivado 2,3 di-O-metil galactitol pode ser oriundo de galactopiranosose ligada (1 →4), com C-2 ou C-3 substituído por grupos acetil ou fosfato.

Tabela IX - METILAÇÃO DO POLISSACARÍDEO COMPONENTE DA MUCILAGEM DE FOLHAS DE *P. aculeata* RESIDUAL DE TRÊS SUCESSIVAS DEGRADAÇÕES TIPO SMITH SEQUENCIADAS E ANÁLISE POR G.L.C.

Alditóis acetilados	T*		%	
	Coluna A	Coluna B	Coluna A	Coluna B
2,3,4 tri- <u>O</u> -metil ramnitol	0,46	0,38	14,00	14,00
2,3,5 tri- <u>O</u> -metil arabinitol	0,46	0,42	14,00	14,00
3,5 di- <u>O</u> -metil ribitol	0,85	0,71	5,00	5,00
2,4 di- <u>O</u> -metil ramnitol	0,93	0,81	15,00	15,00
2,5 ou 2,3 di- <u>O</u> -metil arabinitol	1,14	1,02	9,00	9,00
2,4,6 tri- <u>O</u> -metil glucitol	2,10	1,83	5,00	5,00
2,3,6 tri- <u>O</u> -metil manitol	2,46	2,04	5,00	5,00
2,6 di- <u>O</u> -metil galactitol	3,83	3,25	12,00	12,00
3,6 di- <u>O</u> -metil galactitol	4,10	2,59	18,00	18,00
2,3 di- <u>O</u> -metil galactitol	5,71	4,48	3,00	3,00
???	9,76		2,30	
???	13,22		3,10	
???	16,34		4,82	
???		9,00		3,12
???		10,60		5,14
???		12,17		29,68

*

tempo de retenção relativo ao 1,5 di-O-acetil 2,3,4,6 tetra-O-metil-D-glucitol.

**

calculado em relação ao total de açúcares.

A arabinose e ramnose resistentes podem ser explicadas pela presença de grupos acetil ou fosfato esterificados às posições que impeçam suas oxidações. Grupos acetil ligados ao C-2 de unidades de D-galactose foram encontrados em *Salmonella typhimurium*, constituindo o fator 5-0 (66).

O glicerol presente entre os produtos das degradações tipo Smith (Tabela VIII), é provavelmente oriundo de terminais não redutores de galactofuranose, arabinofuranose, galactopiranosose e xilopiranosose. O treitol pode originar-se da oxidação da galactopiranosose ligada (1 → 4) e dos derivados 2,3,5 tri-O-metil galactitol e 2,5 di-O-metil galactitol do polissacarídeo metilado (Tabela VI).

Os resultados da metilação, oxidação com periodato e degradação de Smith e hidrólises ácidas parciais confirmam uma estrutura bastante ramificada para esse polissacarídeo, formado principalmente por unidades de arabinose e galactose, e diferente das estruturas até o presente propostas para arabinogalactanas de gomas e mucilagens (46, 79, 109).

As análises físico-químicas foram efetuadas com solução da mucilagem que apresentava pH 4,7.

Aplicando-se a equação $\mu = \mu_0 \frac{d}{d_0} \frac{t}{t_0}$, para a determi-

ção da viscosidade absoluta da solução do polissacarídeo extraído de folhas de *Pereskia aculeata*, à temperatura de 20°C, conhecendo-se o valor de μ_0 para o solvente utilizado (água), a densidade da solução ($d = 0,9839$ g/ml) e a densidade da água ($d_0 = 1,0$ g/ml), obteve-se um valor de 4,44 poises, para μ_{abs} .

O cálculo da viscosidade intrínseca foi feito graficamente lançando o valor da viscosidade reduzida (μ_{red}), contra concentração (g/%) (103, 132), para as temperaturas de 20 e 25°C. Observando-se a figura 9, para C tendendo a 0, verifica-se que os valores da viscosidade intrínseca $[\mu]$ correspondem a 7,00 e 7,90 (100 ml/g), para as temperaturas de 20 e 25°C, respectivamente.

Os dados da literatura para as arabinogalactanas já estudadas indicam valores de 6,3 a 157 à 20°C (ml/g) (46).

Viscosidades intrínsecas superiores só são encontra-

das entre as carragenanas, com valores compreendidos entre 6,0 a 14,2 (100 ml/g) (124, 126). Nessas macromoléculas, as funções OH encontram-se parcialmente esterificadas pelo ácido sulfúrico (131). Os altos valores de $[\mu]$ obtidos para a mucilagem de *P. aculeata*, podem ser explicados, pela presença de grupos fosfatos, que são facilmente hidratados e podem conduzir a formação de soluções viscosas e estáveis.

A polidispersibilidade das arabinogalactanas em solução, ocasiona formas e tamanhos diferentes que afetam a viscosidade, conduzindo a resultados aparentes de P.M., quando da aplicação da fórmula de Mark-Houwink, para a conversão de μ em P.M. (132). A tentativa de se determinar o peso molecular por meio da osmolaridade resultou infrutífera. Entretanto, os dados obtidos na filtração em gel de Sepharose 6B, já haviam indicado um valor superior a $1,0 \times 10^6$ (134). Todavia, é possível que o polímero forme agregados moleculares, devido à sua natureza coloidal (108). A propriedade de formar coacervados é atribuída a estruturas altamente ramificadas, que possuem muitas regiões de sequência regular de carboidratos e que, promovem situações ideais de interação com outras macromoléculas.

Segundo CLARKE e colaboradores (46), para as proteoglicanas o grau de substituição das proteínas por polissacarídeos, bem como a forma e flexibilidade dos substituintes, influencia o comportamento de tais macromoléculas, quando em solução. A característica dos substituintes é determinada por parâmetros tais como: tipo de ligação, grau de ramificação e conteúdo de ácidos urônicos, os quais têm a capacidade de interagir em soluções aquosas. Em arabinogalactanas extraídas de *A. senegal*, o aumento do peso molecular e do conteúdo proteico ocasiona um aumento da viscosidade. Já, a relação entre o grau de ramificação e a viscosidade é aparente. Assim, a arabinogalactana de *L. humilis*, é altamente ramificada e tem baixa viscosidade (9,6 ml/g ; P.M. 31×10^5 ; proteína 1,75%), enquanto a goma de *C. hartmannianum*, contem longas e esparsas cadeias ramificadas, com formas de hélices abertas e com alta viscosidade (63 ml/g; P.M. $6,4 \times 10^5$; proteína 4,0%).

O estudo da viscosidade não dá nenhuma idéia do tamanho e forma da partícula, uma vez que a viscosidade intrínseca é independente do tamanho da partícula, mas é sensível à sua forma e capacidade de hidratação. A viscosidade mede a interação soluto-solvente e elimina os efeitos complexos das interações soluto-soluto (108).

As alterações na viscosidade da mucilagem de *P. aculeata* provocadas por mudanças de pH estão demonstradas na figura 10. Nesse gráfico há uma faixa de pH compreendida entre 4,4 e 5,6 onde a viscosidade reduzida é máxima, para a temperatura de 25°C. Acima e abaixo desses valores de pH essa viscosidade é menor. Isso pode ser atribuído ao efeito repulsivo dos grupos carboxílicos carregados negativamente (repulsão Coulombiana), que é maior na faixa de pH 4,4 - 5,6. Havendo repulsão a cadeia é estendida e pode haver um aumento na capacidade de hidratação (72).

Grupos carboxílicos tendem a se ionizar em pH acima de 4,0. Abaixo de pH 3,0 a concentração de H^+ aumenta e, a dissociação dos carboxilatos é reprimida (108). No caso do polissacarídeo de *P. aculeata*, os grupos carboxílicos são oriundos tanto do ácido urônico, como de proteínas. Nessa molécula polissacarídica a carga iônica pode ser mantida, inclusive a dos íons fosfato, e é estável, mesmo em baixos valores de pH, conservando um alto grau de hidratação (137). Em pH acima de 6,0 a viscosidade decresce, possivelmente devido a capacidade maior dos íons HO^- , nesse valor de pH, complexarem-se com os íons Ca^{++} e que ocorrem naturalmente na amostra (Tabela I). Esses cátions são capazes de produzir pontes salinas estabilizadas intra e intermolecularmente (106).

A figura 11 demonstra que a viscosidade varia irregularmente em função da temperatura, verificando-se um máximo à 25°C e que, acima de 30°C, a viscosidade é muito pouco alterada.

A redução da viscosidade pela adição de sais está indicada nas figuras 12A a 12F, onde se verifica que a presença do íon Na^+ induz uma viscosidade maior em comparação ao íon K^+ . Tam

bém em presença do NaCl a viscosidade é maior relativamente aos outros sais, pelo acréscimo na molaridade do mesmo (107). A presença de íons de mesmo sinal e da mesma valência produzem valores de diferentes viscosidades, uma vez que o fluxo de escoamento do líquido cria uma corrente potencial que, por seu turno origina uma pressão eletrosmótica oposta a esse fluxo (108). Nesse ensaio, observa-se que a presença de íons afeta a capacidade de hidratação, diminuindo a viscosidade pelo aumento da força iônica.

A modificação da viscosidade relativa, conforme indica a figura 13, pode ser explicada por uma modificação da forma da molécula, que por sua vez altera a viscosidade intrínseca, e ocasiona uma pequena interação partícula-partícula, decorrente da perda da capacidade de hidratação. Os ânions da série de Hofmeister que afetam a viscosidade no sentido de maior decréscimo são: $I^- > Br^- > Cl^-$, os quais, também, podem conduzir a uma modificação da estrutura macromolecular (72, 103, 107).

Embora, os resultados obtidos, não tenham conduzido à possibilidade de conclusões foram apresentados. Porque alguns são inesperados, talvez, mereçam continuidade de estudo. Suas gestões, nesse sentido, podem surgir do próprio exame da tese.

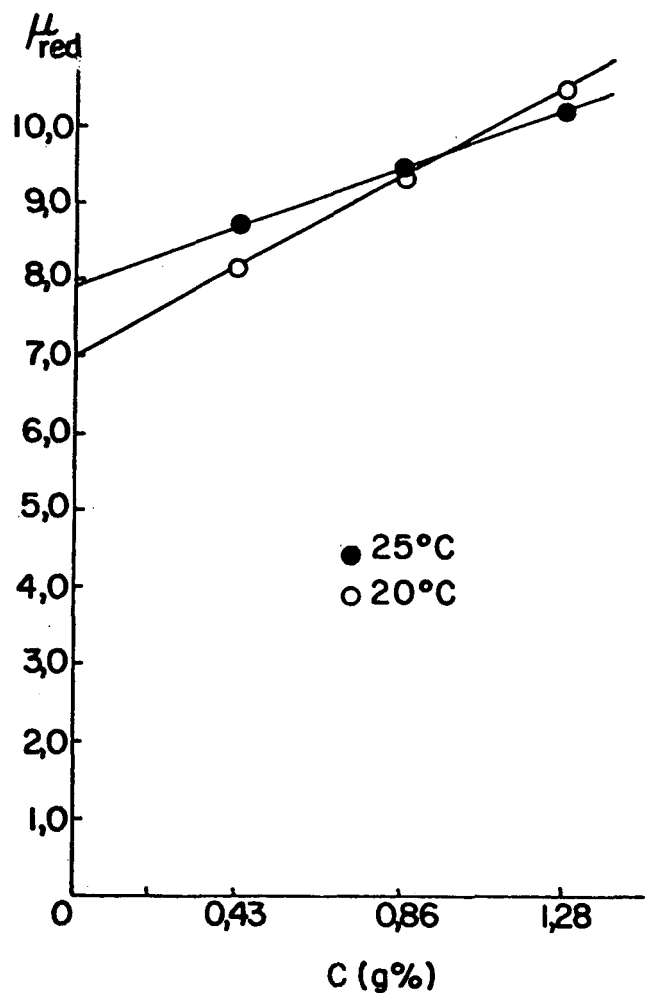


FIGURA 9 - Determinação da viscosidade intrínseca da mucilagem de folhas de *P. aculeata*, em pH 4,7.

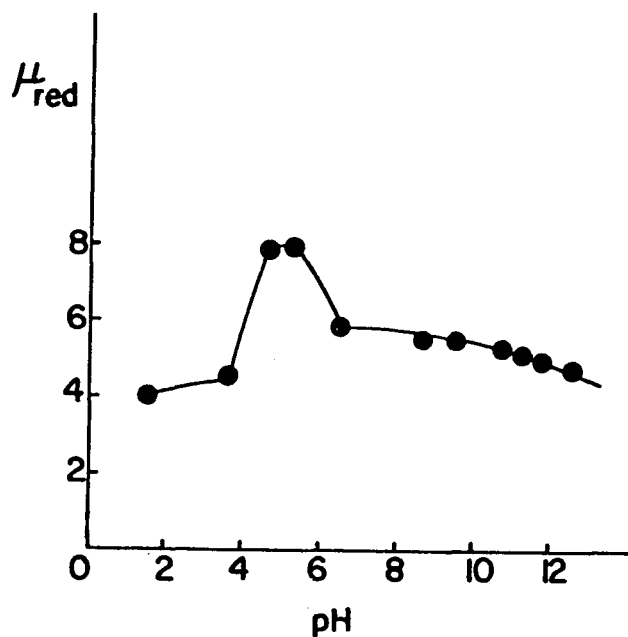


FIGURA 10 - Efeito do pH sobre a viscosidade reduzida da mucilagem de folhas de *P. aculeata*.

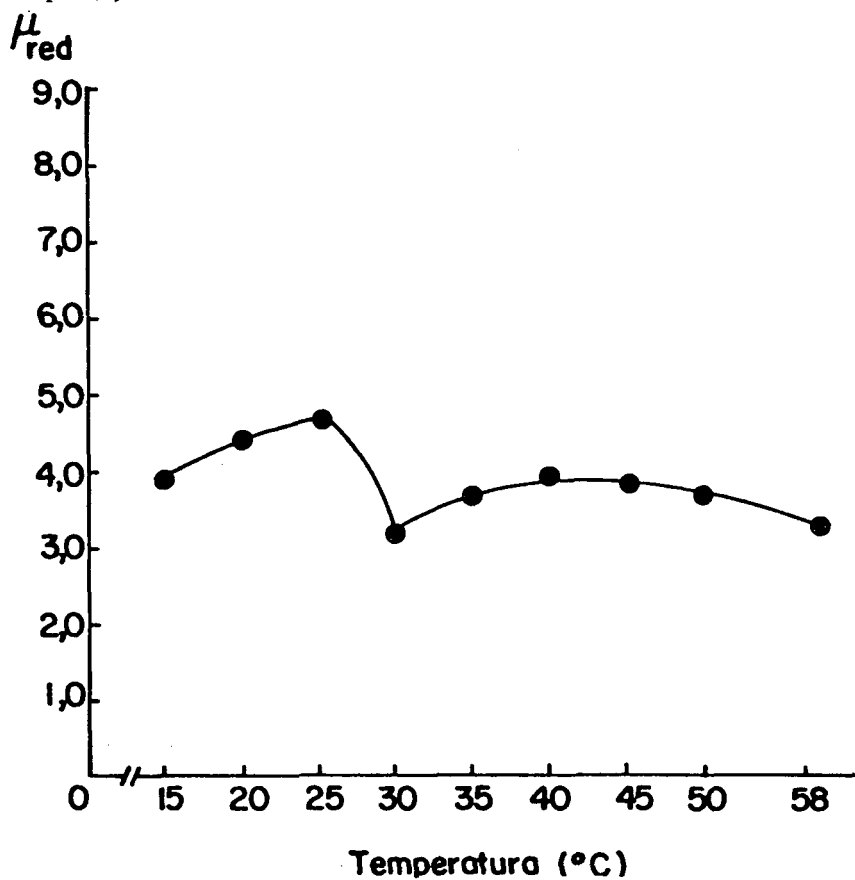


FIGURA 11 - Efeito da variação da temperatura sobre a viscosidade reduzida da mucilagem de folhas de *P. aculeata*, em pH 4,7.

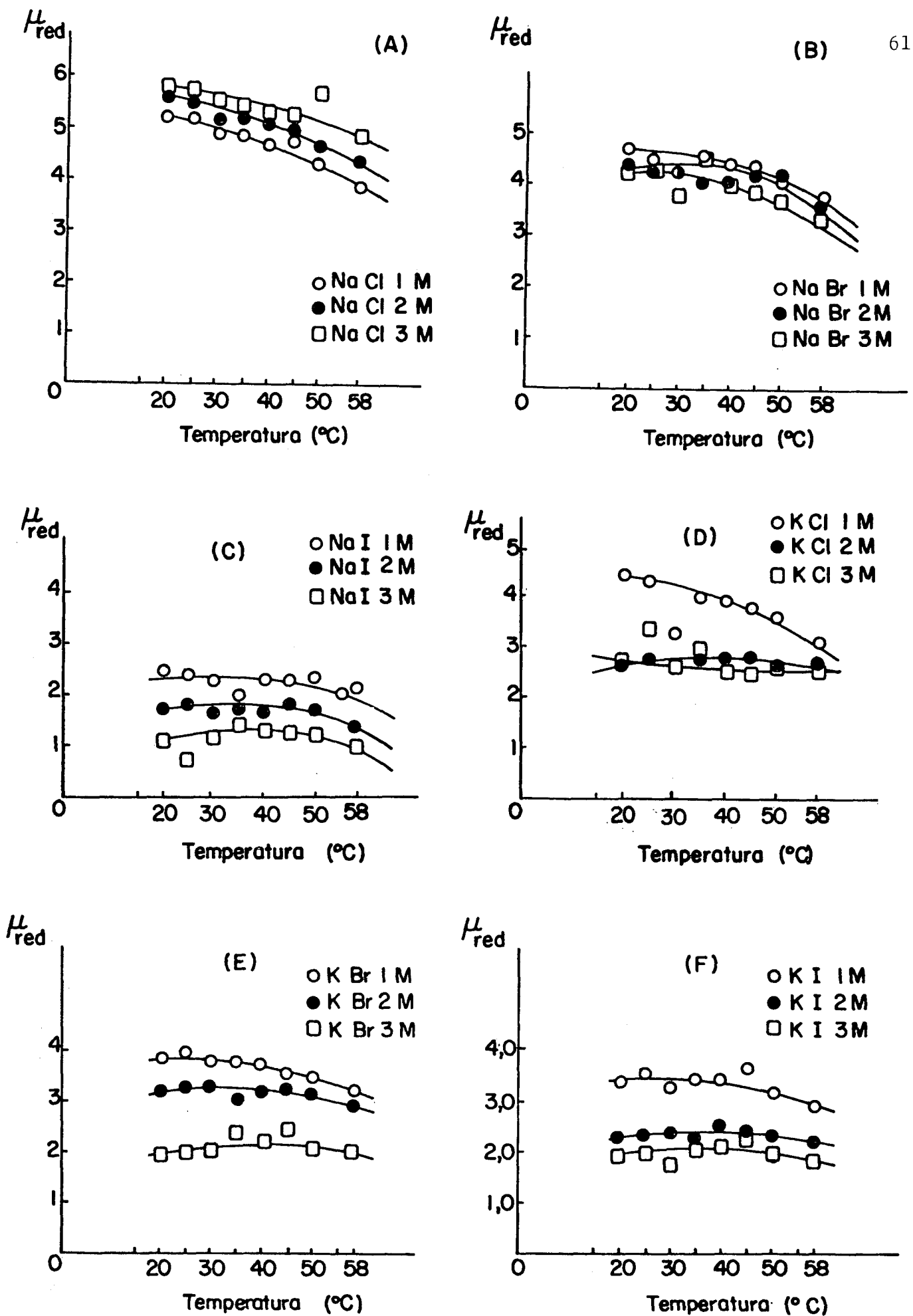


FIGURA 12 - Efeito de eletrólitos, em diferentes molaridades, e da temperatura, sobre a viscosidade reduzida da mucilagem de folhas de *P. aculeata*, em pH 4,7.

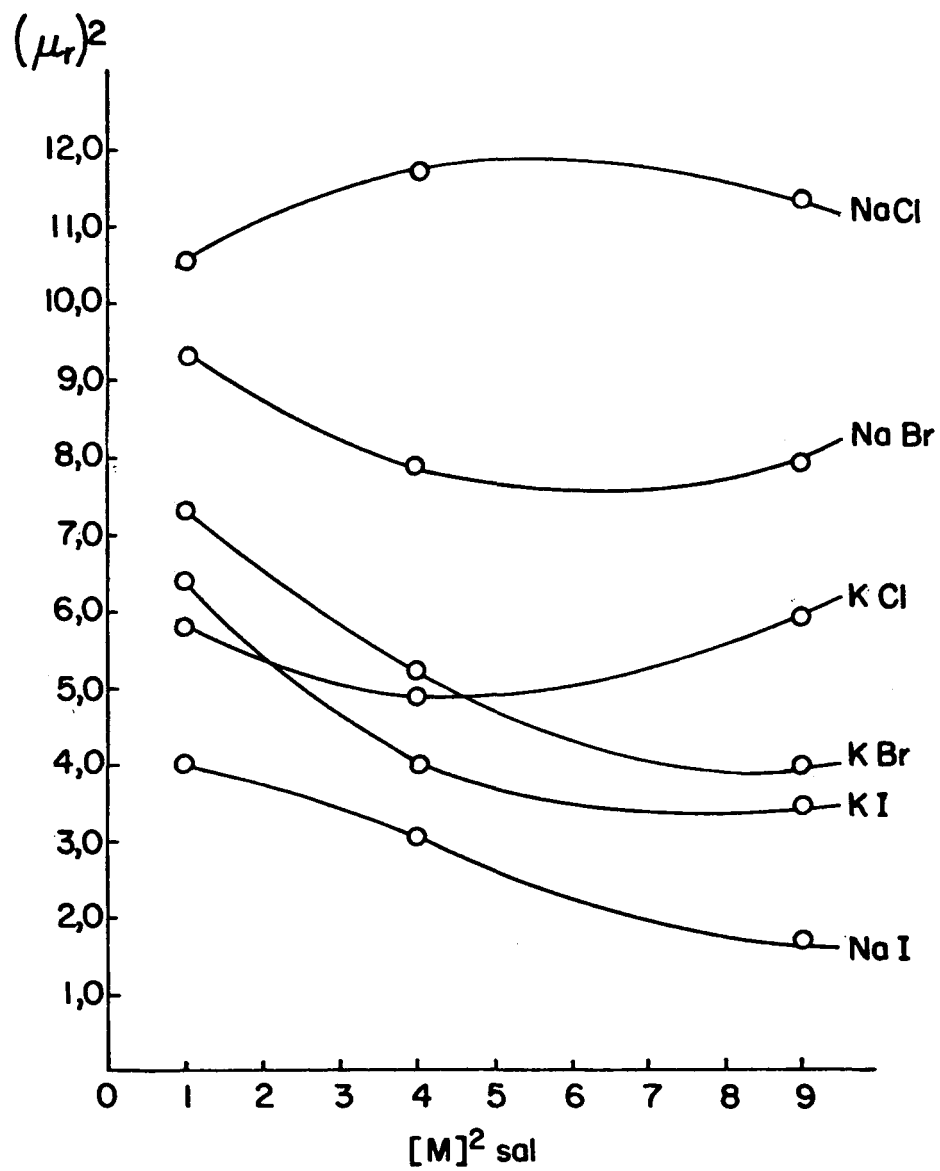


FIGURA 13 - Efeito de eletrólitos, em diferentes molaridades, sobre a viscosidade relativa da mucilagem de folhas de *P. aculeata*, em pH 4,7.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDEL-AKHER, M.; HAMILTON, J.K.; MONTGOMERY, R.; SMITH, F. A new procedure for the determination of the fine structure of polysaccharides. J. Am. Chem. Soc., 74: 4970-4971, 1952.
2. ADAMS, G.A. Acid hydrolysis of weak linkages. In: WHISTLER, R.L. ed. General Polysaccharides. New York, Academic, 1965. p. 285-287. (Methods in Carbohydrate Chemistry, 5).
3. ALLEN, A.K. & NEUBERGER, A. The purification and Properties of the Lectin from Potato Tubers, a Hydroxyproline - Containing Glycoprotein. Biochem. J., 135: 307-314, 1973.
4. AMARAL, D.; KELLY-FALCOZ, F.; HORECKER, B.L. Galactose oxidase of *Poliporus circinatus*. In: WOOD, W.A. ed. Carbohydrate metabolism. New York, Academic, 1966. p. 87-92. (Methods in Enzymology, 9).
5. AMIN, E.S.; AWAD, A.M.; EL-SAYED, M.M. The mucilage of *Opuntia ficus-indica* mill. Carbohydr. Res., 15: 159-161, 1970.
6. ANDERSON, D.M.W.; HIRSTH, E.; STODDART, J.F. Studies on Uronic Acid Materials. Part XXI. Some Structural Features of *Acacia arabica* Gum. J. Chem. Soc. (C): 1476-1485, 1967.
7. ANDERSON, D.M.W. & HENDRIE, A. The structure of *Lannea humilis* Gum. Carbohydr. Res., 22: 265-279, 1972.
8. ANDERSON, D.M.W. & HENDRIE, A. The structure of *Lannea comandelica* Gum. Carbohydr. Res., 26: 105-115, 1973.
9. ANDERSON, D.M.W.; BELL, P.C.; MILLAR, J.R.A. Composition of Gum Exudates from *Anacardium Occidentale*. Phytochemistry, 13: 2189-2193, 1974.

10. ANDERSON, D.M.W. & BELL, P.C. Analytical and Structural Features of the gum exudate from *Combretum hartmannianum* Schweinf. Carbohydr. Res., 49: 341-349, 1976.
11. ANGELY, J. Flora Analítica do Paraná. Curitiba, Edições Phyton, 1965, v. 7, 467 p.
12. ANTONOPOULOS, C.A. A modification for the determination of sulphates in mucopolysaccharides by the benzidine method. Acta Chem. Scand., 16: 1521-1522, 1962.
13. ARTURSON, G. & GRANATH, K. Dextrans as test molecules in studies of the functional ultrastructure of Biological Membranes. Clin. Chim. Acta, 37: 309-322, 1972.
14. ASPINALL, G.O. & BAILLIE, J. Gum Tragacanth. Part I. Fractionation of the gum and the Structure of Tragacanthic Acid. J. Chem. Soc., 1702-1714, 1963.
15. ASPINALL, G.O.; COTTRELL, I.W.; EGAN, S.V.; MORRISON, I.M.; WHITE, J.N.C. Polysaccharides of soy-beans. Part IV. Partial Hydrolysis of the Acidic Polysaccharide Complex from Cotyledon Meal. J. Chem. Soc., C: 1071-1080, 1967.
16. ASPINALL, G.O.; BEGBIE, R.; HAMILTON, A.; WHITE, J.N.C. Polysaccharide from Cotyledon Meal. J. Chem. Soc., C: 1065-1070, 1967.
17. ASPINALL, G.O.; GESTETNER, B.; MOLLOY, J.A.; WALDIN, M. Pectic substances from Lucerne (*Medicago sativa*). Part II. Acidic Oligosaccharides from Partial Hydrolysis of Leaf and Stem Pectic Acids. J. Chem. Soc., C, 2554- 2556, 1968.
18. ASPINALL, G.O. Gums and mucilages. Adv. Carbohydr. Chem., 24: 333-379, 1969.
19. BARDALAYE, P.C. & NORDIN, J.H. Chemical Structure of the Galactomannan from the Cell Wall of *Aspergillus niger*. J.

Biol. Chem., 252: 2584-2591, 1977.

20. BARKER, S.A.; BOURNE, E.J.; WHIFFEN, D.H. Use of infrared Analysis in the Determination of Carbohydrate Structure . In: GLICK, D. ed. Methods of Biochemical Analysis. New York, Interscience, 1956. v. 3 p. 213-245.
21. BARRET, A.J. & NORTHCOTE, D.H. Apple Fruit Pectic Substances. Biochem. J., 94: 617-627, 1965.
22. BARTLETT, G.R. Phosphorus Assay in Column Chromatography . J. Biol. Chem., 234: 466-468, 1959.
23. BEAVEN, G.H.; HIRST, E.L.; & JONES, J.K.N. Pectic Substances. Part V. The Molecular Structure of Strawberry and Apple Pectic Acids. J. Chem. Soc.: 1218-1221, 1947.
24. BEAVEN, G.H. & JONES, J.K.N. Pectic Substances. Part IV. Citrus Arabin. J. Chem. Soc.: 1865-1868, 1939.
25. BeMILLER, J.N. Acid-catalysed hydrolysis of glycosides. Adv. Carbohydr. Chem., 22: 25-108, 1967.
26. BEVERIDGE, J.R.; STODDART, J.F.; SZAREK, W.A.; JONES, J.K.N. Some structural features of the mucilage from the bark of *Ulmus fulva* (Slippery elm mucilage). Carbohydr. Res., 9: 429-439, 1969.
27. BINKLEY, W.W. & WOLFROM, M.L. Composition of Cane Juice final Molasses. Adv. Carbohydr. Chem., 3: 292-295, 1948.
28. BISHOP, C.T.; BLANK, F.; HRANSAVLJEVIC-JAKOVLJEVIC, M. The water-soluble polysaccharides of dermatophytes. I. A galactomannan from *Trichophyton granulosum*. Can. J. Chem., 40: 1816-1825, 1962.
29. BISHOP, C.T.; PERRY, M.B.; BLANK, F.; COOPER, F.P. The water-soluble polysaccharides of dermatophytes IV. Galacto-

- mannans I from *Trichophyton granulorum*, *T. interdigitale*, *Microsporium quinckeanum*, *T. rubrum* and *T. schenleinii* Can. J. Chem., 43: 30-39. 1965.
30. BITTER, T. & MUIR, H.M. A modified Uronic Acid carbazole reaction. Anal. Biochem., 4: 330-334, 1962.
31. BJØRNDAL, H.; HELLERQVIST, C.G.; LINDBERG, B.; SVENSSON, S. Gas-Liquid chromatography and mass-spectrometry in methylation analysis of polysaccharides. Angew. Chem. Int. Ed. 9: 610-619, 1970.
32. BLAKE, J.D. & RICHARDS, G.N. A Critical Re-examination of Problems Inherent in Compositional Analysis of Hemicelluloses by Gas-Liquid Chromatography. Carbohydr. Res., 14 : 375-387, 1970.
33. BOAS, N.F. Method for the determination of hexosamines in tissues. J. Biol. Chem., 204: 553-563, 1953.
34. BOUVENG, H. & LINDBERG, B. Studies on Arabogalactans. 1. Products from the Mild Hydrolysis of the Arabogalactan from *Larix occidentalis*. Acta Chem. Scand., 10: 1515-1519, 1956.
35. BOUVENG, H.O. & LINDBERG, B. Studies on Arabogalactan. II Fractionation of the arabogalactan from *Larix occidentalis* Nutt. A methylation Study of one of the Components. Acta Chem. Scand., 12: 1977-1984, 1958.
36. CAMINHOÁ. J.M. Elementos de Botânica Geral e Médica, Rio de Janeiro, Typographia Nacional, 1877. p. 126-133, 2179-2182.
37. CARTER, H.E.; GIGG, R.H.; LAW, J.H.; NAKAYAMA, T., WEBER, E. Biochemistry of the Sphingolipids. XI. Structure of Phytoglycolipid. J. Biol. Chem., 233: 1309-1314, 1958.

38. CARTER, H.E., M BROOKS, S.; GIGG, R.H.; STROBACH, D.R.; SUAMI, T. Biochemistry of the Sphingolipids. XVI. Structure of Phytoglycolipid. J. Biol. Chem., 239: 743-746, 1964.
39. CARTER, H.E.; BETTS, B.E.; STROBACH, D.R. Biochemistry of the Sphingolipids. XVII. The Nature of the Oligosaccharide Component of Phytoglycolipid. Biochemistry, 3: 1103 - 1107, 1964.
40. CARTER, H.E. & KISIC, A. Countercurrent Distribution of inositol lipids of plant seeds. J. Lipid Res., 10: 356-362, 1969.
41. CARTER, H.E. & KOOB, J.L. Sphingolipids in bean leaves (*Phaseolus vulgaris*). J. Lipid Res., 10: 363-369, 1969.
42. CARTER, H.E.; STROBACH, D.R.; HAWTHORNE, J.N. Biochemistry of the Sphingolipids. XVIII. Complete Structure of Tetrasaccharide Phytoglycolipid. Biochemistry, 8: 383-388, 1969.
43. CHAMBAT, G.; JOSELEAU, J.P.; LAPEYRE, M.; LEFEVRE, A. Presence of D-galactofuranose in the capsular polysaccharide of *Klebsiella* serotype K-41: synthesis of 5,6-di-O-methyl-D-Galactofuranose. Carbohydr. Res., 63: 323-326, 1978.
44. CHURMS, S.C. Gel Chromatography of Carbohydrate. Adv. Carbohydr. Chem., 25: 13-51, 1970.
45. CLARK, E.P. & COLLIP, J.B. Studies of the Tisdall Method for the Determination of Blood Serum Calcium with a Suggested Modification. J. Biol. Chem., 63: 461, 1625.
46. CLARKE, Z.E.; ANDERSON, R.L.; STONE, B.A. Form and function of arabinogalactan and arabinogalactan-proteins. Phytochemistry, 18: 521-540, 1979.
47. COREY, E.J. & CHAYKOVSKY, M. Methylsulfinylcarbanion. J. Am. Chem. Soc., 84: 866-867, 1962.

48. CORRÊA, J.B.C. Métodos químicos para a determinação da estrutura de polissacarídeos. Curitiba, 1971. 62 p. (Monografia didática).
49. CORRÊA, J.B.C. & FONTANA, J.D. Polysaccharide from the Epicarp and Mesocarp of Coffee Cherries. Part I. Some Structural Studies of Neutral Galactoaraban. An. Acad. Brasil. Ciênc., 43: 803-812, 1971.
50. CORRÊA, J.B.C.; ODEBRECHT, S.; FONTANA, J.D. Polissacarídeos do Epicarpo e do Mesocarpo de Café Cereja. Parte II. Fracionamento e Hidrólise Ácida Parcial de Pectina Solúvel em Água. An. Acad. Brasil. Ciênc., 46: 350-356, 1974.
51. CORRÊA, M.P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Plantas Exóticas Cultivadas. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura. Inst. Brasil. de Desenv. Florestal, 1974. v.5. p. 315.
52. COSTA, A.F. Substâncias Poliurônicas. In: Farmacognosia. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 1970. v.2. p. 84-125.
53. DANISHEFSKY, I.; WHISTLER, R.K.; BETTELHEIM, F.A. Introduction to Polysaccharide Chemistry. In: PIGMAN, W. & HORTON, D. ed. The Carbohydrates Chemistry and Biochemistry. New York, Academic, V.2A, 1970. p. 375-412.
54. DAS, N.N.; DAS, A.; MUKHERJEE, A.K. Structure of the D-Galactan isolated from Garlic (*Allium sativum*) Bulbs. Carbohydr. Res., 56: 337-349, 1977.
55. DAYRELL, M.S. & VIEIRA, E.C. Leaf Protein Concentrate of the Cactacea *Pereskia aculeata* Mill. I. Extraction and Composition. Nutr. Rep. Int., 15: 529-537, 1977.
56. DAYRELL, M.S. & VIEIRA, E.C. Leaf Protein Concentrate of the Cactacea *Pereskia aculeata* Mill. II. Nutritive Value.

Nutr. Rep. Int., 15: 539-545, 1977.

57. DENT, C.E. A study of the behaviour of some sixty amino-acids other ninhydrin-reaction substances on phenol-"collidin" filter-paper chromatogram with note as to the occurrence of some of them in Biological fluids. Biochem. J., 43: 169-180, 1948.
58. DESCOLE, R.H. Genera et Spécies Plantarum Argentinarum, Buenos Aires, Sociedade Anonima de Impresiones Generalis, 1943. V. 1, p. 49-79.
59. DEY, P.M. Biochemistry of α -D-Galactosidic Linkages in the Plant Kingdom. Adv. Carbohydr. Chem., 37:284-372, 1980.
60. DISCHE, Z. Color Reactions of Hexosamines. In: WHISTLER, R. L. & WOLFROM, M.L. ed. Analysis and preparation of Sugars. New York, Academic, 1962. p.507-512 (Methods in Carbohydrate Chemistry, 1).
61. DYER, J.R. Use of Periodate Oxidation in Biochemical Analysis. In: GLICK, D. ed. Methods of Biochemical Analysis. New York, Interscience, 1956. v. 3, p. 111-147.
62. DOWNS, F. & PIGMAN, W. Determination of O-Acetyl groups by the Hestrin method. In: WHISTLER, R.L. & BeMILLER, J.N.ed. General methods, Glycosaminoglycans, and Glycoproteins. New York, Academic, 1976. p. 241-243. (Methods in Carbohydrate Chemistry, 7).
63. DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; ROBERTS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal. Chem., 28:350-356, 1956.
64. DUDMAN, W.F. & BISHOP, C.T. Electroforesis of Dyed Polysaccharides on cellulose acetate. Can. J. Chem., 46: 3079 - 3084, 1968.

65. EAGLER, H., OYAMA, V.I.; LEVY, M.; FREEMAN, A.E. Myo-Inositol as an Essential Growth factor for normal and malignant human cells on tissue culture. J. Biol. Chem., 226: 191-206, 1957.
66. ELLERQVIST, C.G.; LINDBERG, B.; SVENSSOM, S.; HOLME, T.; LINDBERG, A.A. Structural Studies on the O-Specific side-chains of the Cell-Wall Lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium* 395 MS. Carbohydr. Res., 8: 43-45, 1968.
67. FABIO, J. & DUTTON, G.G.S. Structural Investigation of the Capsular Polysaccharide of *Klebsiella* Serotype K26. Carbohydr. Res., 92: 287-298, 1981.
68. FINCHER, G.B.; SAWYER, W.H.; STONE, B.A. Chemical and Physical Properties of Arabinogalactan - Peptide from Wheat Endosperm. Biochem. J., 139: 535-545, 1974.
69. FONT QUER, P. Plantas Medicinales El Dioscórides Renovado, Barcelona, Labor, 1962. 163 p.
70. GLASSTONE, S. and LEWIS, D. Elements of Physical Chemistry, New York, D. Van Nostrand, 1966. 597 p. 2. ed.
71. GANDER, J.E.; JENTOFT, N.H.; DREWES, L.R.; RICK, P.D. The 5-O- β -D-galactofuranosyl-containing exocellular glycopeptide of *Penicillium charlessi*. J. Biol. Chem., 249: 2063-2072, 1974.
72. GLICKSMAN, M. & SCHACHAT, R.E. Gum Arabic. In: WHISTLER, R.L.; BE MILLER, J.N. Industrial Gums. New York, Academic, 1959. p. 213-298.
73. GOLDSTEIN, I.J.; HAY, G.W.; LEWIS, B.A.; SMITH, F. Controlled degradation of Polysaccharides by periodate oxidation, reduction, and hydrolysis. In: WHISTLER, R.L. ed. General Polysaccharides. New York, Academic, 1965. p. 361-370. (Methods in Carbohydrate Chemistry, 5).

74. GONÇALVES, M.L. Cactaceae. Flora de Moçambique. Lisboa, Imprensa Portugues, 1979. v. 82, p. 1.
75. GORIN, P.A.J. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Polysaccharides. Adv. Carbohydr. Chem., 38: 68-72, 1981.
76. GORIN, P.A.J.; BARRETO-BERGTER, E.M.; CRUZ, F.S. The chemical structure of the D-galacto-D-mannan component of *Trypanosona cruzi*. ¹³C-n.m.r. shift dependence on structure of D-galactose to D-mannose linkage. Carbohydr. Res., 88: 177-188, 1981.
77. GOTTLIEB, M. Polysaccharides of *Critidia fasciculata*: Identification and partial characterization of a cell surface constituent. Biochim. Biophys. Acta, 541: 444-458, 1978.
78. HAKAMORI, S. A rapid Permethylation of Glycolipid and Polysaccharide Catalysed by Methylsulfinil Carbanion in Dimethyl Sulfoxide. J. Biol. Chem., 55: 205-207, 1964.
79. HANESSIAN, S. & HASKELL, T.H. Antibiotics Containing Sugars. In: PIGMAN, W. & HORTON, D. ed. The Carbohydrates Chemistry and Biochemistry, New York, Academic, 1970, v.2A, p. 139-211.
80. HAQ, S. & ADAMS, G.A. Structure of arabinogalactan from *Tamarack (Larix Laricina)*. Can. J. Chem., 39: 1563 - 1573, 1961.
81. HAWORTH, W.N. A new method of preparing alkylated sugars. J. Chem. Soc., 107: 8-16, 1915.
82. HAY, G.W.; LEWIS, B.A.; SMITH, F. Periodate Oxidation of Polysaccharides: General Procedures. In: WHISTLER, R.L. ed. General Polysaccharides. New York, Academic, 1965. p. 357-361. (Methods in Carbohydrate Chemistry, 5).
83. HAY, G.W.; LEWIS, B.A.; SMITH, F.; UNRAU, A.M. Determination of reducing End-groups by periodate oxidation. In: WHISTLER, R.L. ed. General Polysaccharides. New York, Academic, 1965. p. 251-253. (Methods in Carbohydrate Chemistry, 5).

84. HIRST, E.L. & JONES, J.K.N. Pectic Substances. Part I. The Araban and Pectic Acid of the Peanut. J. Chem. Soc.: 496-505, 1938.
85. HIRST, E.L. & JONES, J.K.N. Pectic Substances. Part VI. The Structure of the Araban from *Arachis Hypogea*. J. Chem. Soc. 1221-1225, 1947.
86. HIRST, E.L.; JONES, J.K.N.; WALDER, W.O. Pectic Substances. Part VII. The Constitution of the Galactan from *Lupinus albus*. J. Chem. Soc.: 1225-1229, 1947.
87. HIRST, E.L. & JONES, J.K.N. Pectic Substances. Part VIII. The Araban Component of Sugar-beet Pectin. J. Chem. Soc. : 2311-2313, 1948.
88. HOUGH, L.; JONES, J.K.N.; WADMAN, W.M. Some Observations of the Constitution of Gum Myrrh. J. Chem. Soc., 796-800, 1952.
89. HOWARD, B.H. Hidrolyses of the soluble Pentosans of wheat Flour and *Rhodymenis palmata* by Ruminal Micro-organism Biochem. J., 67: 643-651, 1954.
90. JACOBS, M.B. Gums, Cereals, Starch, Other Polysaccharides, Flour, and Bread. In: JACOBS, M.B. The Chemical Analysis of Food and Food Products, 3 ed. New York, D. Van Nostrand, 1958. p. 476-508.
91. JONES, A.S. The isolation of bacterial nucleic acids using cetyltrimethylammonium bromide (cetavlon). Biochem. Biophys. Acta, 10: 607-612, 1953.
92. JONES, J.K.N. & SMITH, F. Plant Gums and Mucilages. Adv. Carbohydr. Chem., 4: 243-292, 1949.
93. JONES, J.K.N. Larch E-Galactan. Part II. The isolation of 3- β -L-Arabopyranosyl-L-arabinose. J. Chem. Soc.: 1672 - 1675, 1953.

94. KAUL, K. & LESTER, R.L. Characterization of Inositol-containing Phosphosphingolipids from Tobacco Leaves. Isolation and identification of two novel, major: N-acetylglucosamido-glucoronidoinositol phosphorylceramide and Glucosamidoglucoronidoinositol phosphorylceramide. Plant Physiol., 55: 120-129, 1975.
95. KEMMELMEIER, C. Taxonomia do Fungo Produtor de Galactose Oxidase: Estudos Químicos e Imunológicos. Curitiba, 1981. 90 p. Tese Doutorado. Departamento de Bioquímica. Universidade Federal do Paraná.
96. KENNEDY, J.F. Determination of Formic Acid in the Periodate Oxidation of Carbohydrates. In: WHISTLER, R.L. & BEMLER, J.N. eds. General Carbohydrate Methods. New York, Academic, 1972. p.93-100. (Methods in Carbohydrate Chemistry, 6).
97. KORNFELD, R. & KORNFELD, S. Comparative aspects of Glycoprotein Structure. Annu. Rev. Biochem., 45: 217-237, 1976.
98. LARKIN, P. Plant Protoplast Agglutination by Artificial Carbohydrate Antigens. J. Cell. Sci., 30: 283-292, 1978.
99. LESTER, R.L. & STEINER, M.R. The Occurrence of Diphosphoinositide and Triphosphoinositide in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., 243: 4889-4893, 1968.
100. LESTER, R.L.; SMITH, S.W.; WELLS, G.B.; REEBS, D.C.; ANGUS, W.W. The isolation and Partial Characterization of Two Novel Sphingolipids from *Neurospora crassa*: D(inositolphosphoryl) ceramide and [(gal)₃glu]ceramide. J. Biol. Chem., 249: 3388-3394, 1974.
101. LINDBERG, B. Methylation analysis of Polysaccharides. In: GINSBURG, V. Complex Carbohydrates, part B. New York, Academic, 1972. p- 178-195. (Methods in Enzymology, 28).

102. LINNEU, C. Cactus *Pereskia*, In: VELLOZO, J.M.A.C. Florae Fluminensis. Paris, Sanefelder, 1827. v. 5, p. 26.
103. MARON, S.H. & PRUTTON, C.F. Principles of Physical Chemistry, 4. ed., London, Macmillan, 1965, p. 835-868.
104. MARSHALL, R.D. Glycoproteins. Annu. Rev. Biochem., 41: 673-702, 1972.
105. MCGARVIE, D. & PARDIS, H. The mucilage of *Opuntia ficus-indica*. Carbohydr. Res., 69: 171-179, 1979.
106. McNEELY, W.H. Algin. In: WHISTLER, R.L.; BeMILLER, J. N. Industrial Gums. New York, Academic, 1959. p. 55-82.
107. MISRA, V. & MISRA, V.P. Studies on Viscosity Behavior of Concentrated Sodium and Potassium alides in Aqueous D - Manitol Solution. Carbohydr. Res., 63: 29-40, 1978.
108. MYSELS, K.J. Introduction to Colloid Chemistry. New York, Interscience, 1959, 475, p.
109. NEUKOM, H. & MARWALDER, H. Isolation and characterization of an arabogalactan from wheat flour. Carbohydr. Res., 39: 387-389, 1975.
110. OHLWEILER, O.A. Teoria e prática de análise quantitativa inorgânica, Brasília, Editora Universidade de Brasília, 1968, v. 4, p-1001-4.
111. OVODOV, Y.S.; OVODOVA, R.G.; SHIBAEVA, V.I.; MIKHEYSKAYA, L. V. Further Structural Studies of Zosterine. (Pectic Substances of Zosteraceae: Part XII). Carbohydr. Res., 42: 197-199, 1975.
112. PEAT, S.; WHELAN, W.J.; EDWARDS, T.E. Polysaccharides of Backer's yeast. Part II. Yeast glucan. J. Chem. Soc., 3862-3866, 1958.

113. PETERS, B.M.; CRIBS, D.H.; STELZIG, D.A. Agglutination of Plant Protoplast by Fungal Cell Wall Glucans. Science, 201:364-365, 1978.
114. PUTZTAI, A. & WATT, W.B. Fractionation and characterization of Glycoproteins Containing Hydroxyproline from Leaves of *Vicia faba*. Eur. J. Biochem., 10: 523-532, 1969.
115. ROY, N. & GLAUDEMANS, C.P.J. On the structure of mammalian - lung galactan. Carbohydr. Res., 63: 318-322, 1978.
116. SANDFORD, P.A. & CONRAD, H.E. The structure of aerobacter aerogenes A₃ (S₁) polysaccharides. I. A reexamination using improved procedures for methylation analysis. Biochemistry, 5: 1508-1517, 1966.
117. SAWARDEKER, J.S.; SLONECKER, J.H.; JEANES A. Quantitative Determination of Monosaccharides as their Alditol Acetates by Gas-Liquid Chromatography. Anal.Chem., 37: 1602-1604, 1965.
118. SCHULTZ, T.H. Determination of the Degree of Esterification of Pectin; determination of the Ester Methoxyl Content of Pectin by Saponification and Titration. Determination of the Anhydrouronic Acid content by Decarboxylation and Titration of the Liberated Carbon Dioxide, In: WHISTLER, R.L. ed. General Polysaccharides. New York, Academic, 1965. p.189-194. (Methods in Carbohydrate Chemistry, 5).
119. SCHUMANN, C. Cactacea. In: MARTIUS, C.F.P. Flora Brasiliensis. Weinheim, J. Cramer, 1967. v.4, p. 186-322.
120. SCOTT, J.E. Aliphatic Ammonium Salts in the Assay of Acidic Polysaccharides from Tissues. In: GLICK, D. ed. Methods of Biochemical Analysis. New York, Interscience, 1960. v. 8, p. 145-197.
121. SCOTT, J.E. Fractionation by Precipitation with Quaternary Ammonium Salts. In: WHISTLER, R.L. ed. General Polysaccharides. New York, Academic, 1965. p. 38-44. (Methods in Carbohydrate Chemistry, 5).
122. SELVENDRAN, R.R.; MARCH, J.F.; RING, S.G. Determination of Aldoses and Uronic Acid content of vegetal fiber. Anal. Biochem., 96: 282-292, 1979.

123. SIDDIQUI, I.R.; WOOD, P.J.; KHANZADA, G. A di-D-galactosyl myo inositol from rapessed (*Brassica campestris*) meal. Carbohydr. Res., 29: 225-258, 1973.
124. SMIDSRØD, O.; LARSEN, B.; PERNAS, A.J.; HAUG, A. The Effect of Alkali Treatment on the Chemical Heterogeneity and Physical of Some Carrageenans. Acta Chem. Scand., 21: 2585-2598, 1967.
125. SMITH, R.J. Determination of Moisture. In: WHISTLER, R.L. ed. Starch. New York, Academic, 1964. p. 36-42. (Methods in Carbohydrate Chemistry, 4).
126. SMITH, D.B.; COOK, W.H.; NEAL, J.L. Physical Studies on Carrageenin and Carrageenin Fractions. Arch. Biochem. Biophys. 53: 192-203, 1955.
127. SOLOV'EVA, T.F.; ARSENIUK, L.V.; OVODOV, Y.S. Some Structural Features of *Panax ginseng* C.A. Mey Pectin. Carbohydr. Res., 10: 13-18, 1969.
128. STANĚK J.; ČERNÝ, M.; PACÁK, J. The Monosaccharides. New York Academic, 1965. p. 502-507.
129. STAUB, A.M. Removal of Proteins; Sevag Method. In: WHISTLER, R.L. ed. General Polysaccharides. New York, Academic, 1965. p. 5-6. (Methods in Carbohydrate Chemistry, 5).
130. STODDART, R.W.; BARRET, A.J.; NORTHCOTE, D.H. Pectic Polysaccharides of Growing Plant Tissues. Biochem. J., 102: 194-204, 1967.
131. STOLOFF, L. Carrageenan. In: WHISTLER, R.L.; BeMILLER, J. N. Industrial Gums. New York, Academic, 1959. p. 83-115.
132. SWENSON, H.A. Intrinsic Viscosity and its Conversion to Molecular Weight. In: WHISTLER, R.L. ed. Cellulose. New York, Academic, 1963. p. 84-91. (Methods in Carbohydrate Chemistry, 3).

133. TALMADGE, K.W.; KEEGSTRA, K.; BAUER, W.D.; ALBERSHEIM. The Structure of Plant Cell Walls. The macromolecular components of the walls of suspension-cultured sycamore. Plant Physiol., 51: 158-173, 1973.
134. TONG, H.K.; LEE, K.H.; WONG, H.A. The molecular Weight and Viscosity of the Water-Soluble Polysaccharide(s) from *Eucheuma spinosum*. Carbohydr. Res., 81: 1-6, 1980.
135. TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.S. Detection of Sugars on Paper Chromatograms by Use of Dipping Reagents. Nature, 166: 444-445, 1950.
136. UNRAU, A.M. Carbohydrate of Centrosema seed. The constitution of an arabino galactan I. Can. J. Chem., 42: 916-925, 1964.
137. WHISTLER, R.L. Factors Influencing Gum Cost and Applications. In: WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N. Industrial Gums, New York, Academic, 1959, p. 1-13.
138. WILDER, B.M. & ALBERSHEIM, P. The Structure of Plant Cell Walls. IV. A Structural comparison of the wall Hemicelluloses of cell suspension cultures of sycamore (*Acer Pseudoplatanus*) and Red Kidney Bean *Phaseolus vulgaris*. Plant Physiol., 51: 889-893, 1973.
139. WOLFRON, M.L. & THOMPSON, A. Acetylation. In: WHISTLER, R. L. & WOLFRON, M.L. ed. Reactions of Carbohydrates. New York, Academic, 1963. p. 211-215. (Methods in Carbohydrate Chemistry, 2).
140. WOLFRON, M.L. & PATIN, D.L. Carbohydrates of the Coffee Bean. IV. An Arabinogalactan. J. Org. Chem., 30: 4060-4063, 1965.
141. YAMAGISHI, T.; MATSUDA, K.; WATANABE, T. Isolation and Partial Characterization of proteoglycans from rice bran. Carbohydr. Res., 43: 321-333, 1975.